

Aus der Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. J. A. Auer)

Musculoskeletal-Research-Unit (MSRU)

Eine *in vivo* Studie über die Biokompatibilität
des Bandscheibenersatzstoffes
Annular Sealant Device (ASD)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

Vorgelegt von
Bastian Brand
Tierarzt
aus Bidingen (Deutschland)

Genehmigt auf Antrag von
PD Dr. B. von Rechenberg, Referentin
PD Dr. N. Boos, Korreferent

Zürich 2003
Zentralstelle der Studentenschaft

Gewidmet meinem Bruder Nepomuk A. R. Brand

<i>Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde</i>	<i>1</i>
<i>Widmung</i>	<i>2</i>
<i>Einleitung</i>	<i>5</i>
Die Nomenklatur und Klassifikation von Bandscheibenvorfällen	5
Anatomie und Funktion der Bandscheibe (Diskus intervertebralis)	8
Der Nukleus pulposus (NP)	9
Der Anulus fibrosus (AF)	10
Die hyalinknorpelige Endplatte (EP)	12
Degenerative Veränderungen der Bandscheibe	13
Degeneration des Nukleus pulposus	14
Degeneration des Anulus fibrosus	16
Degeneration der Hyalinknorpeligen Endplatte	18
Der Bandscheibenvorfall / Herniation	21
Failed Back Surgery Syndrome/ Postdiskektomiesyndrom	27
Diskusdegeneration beim Hund	30
Herniation beim Hund	31
Reherniationen beim Hund	33
Fenestration der Bandscheibe in der Humanmedizin	33
Die künstliche Bandscheibe	34
Annular Sealant Device (ASD)	37
Entzündungsmediatoren	39
Polymerase-Kettenreaktion	45
Prinzip der Real time PCR	46
<i>Material und Methode</i>	<i>47</i>
Präoperatives Procedere	47
Der Operative Zugang für die Implantation des Annular Sealant Device zwischen den Lendenwirbeln 2 und 3	49
Die Schlachtung erfolgte nach 3, 5, 6, 7 und 9 Monaten mit makroskopischer Beurteilung	52
Probenaufbereitung	53
Probenauswertung	56

Resultate	60
Die makroskopische Beurteilung	61
Die histologische Beurteilung	63
Histologische Untersuchungsergebnisse des Bandscheibenpräperates:	67
Auswertung des modifizierten Schemas nach Gries et al. :	69
Ausmessung des Zwischenwirbelraums :	71
Auswertungen der Real time PCR:	72
Relationen zum Alter oder zum Gewicht :	75
Zusammenfassung der Resultate :	77
Diskussion	79
Zusammenfassung	85
Referenzen	89
Anhang	98
1. Blutparameter und Referenzwerte	98
2. Protokoll der neurologischen Untersuchung	98
3. Präparationsprotokoll der Bandscheibenproben	98
4. Protokoll des Umschreibens von RNA in cDNA	99
5. Liste der verwendeten Primer	100
Danksagung	105
Curriculum vitae	106
Bildanhang	107

Einleitung

Die Nomenklatur und Klassifikation von Bandscheibenvorfällen

Uneinheitliche und mangelhafte Definitionen der Bandscheibenpathologie führten zu einem Übereinkommen der North American Spine Society, American Society of Spine Radiology und der American Society of Neuroradiology um unter anderem nachfolgende Begriffe zu definieren.

Normal: Der junge, morphologisch normale Diskus intervertebralis

Degeneration/ degenerativ: Dieser Begriff umfasst Desikkation, Fibrose, Annäherung des Zwischenwirbelraums, diffuses Hervorwölben des Anulus fibrosus, extensive Fissuren des Anulus fibrosus, mucinöse Veränderungen vom Anulus fibrosus, Defekte und Sklerosis der Endplatte und Osteophyten an der Wirbelapophyse. Ein Diskus intervertebralis, der eine oder mehrere degenerative Veränderungen aufweist, kann weiter in die 2 Subkategorien aufgeteilt werden;

1. Spondylosis deformans, mit Hinweis auf alterungsbedingte Veränderungen.
2. Osteochondrosis intervertebralis, mit Hinweis auf pathologische Prozesse.

Herniation: Die lokale Verlagerung von Diskusmaterial hinter die Grenzen des Zwischenwirbelraumes, hierbei kann es sich um Nukleusgewebe, Knorpel, fragmentierter apophysärer Knochen und Anulusgewebe, sowie Kombinationen der Gewebe handeln. Der Zwischenwirbelraum ist definiert kranial und kaudal von der Endplatte der Wirbelkörper und in der Peripherie von der äusseren Ecke der Wirbelapophyse (osteophytische Veränderungen sind nicht mit eingeschlossen). Der Begriff „lokal“ steht im Gegensatz zu „generalisiert“, letzteres wurde willkürlich definiert als über 50 % (180°) der Diskusperipherie. Die lokale Verlagerung kann weiter unterteilt werden in „fokal“ unter 25 % und

„breit-basig“ 25-50% der Diskusperipherie. Generalisierte Verlagerungen von 50-100% sind Hervorwölbungen und werden nicht als Herniation in Betracht gezogen.(siehe Abb. 1)

Protrusion: Diese liegt vor, wenn die Distanz zwischen dem Diskusmaterial hinter dem Zwischenwirbelraum und der Basislinie kleiner ist als die Distanz der Basislinie.(Abb. 2)

Extrusion: Diese liegt vor, wenn die Distanz zwischen dem Diskusmaterial hinter dem Zwischenwirbelraum und der Basislinie grösser ist als die Distanz der Basislinie.(Abb. 3) Die Extrusion kann weiter spezifiziert werden in eine Sequestration, falls verlagertes Diskusmaterial komplett an Kontinuität zum ursprünglichen Diskus verloren hat.

Migration liegt vor, wenn verlagertes Material, unabhängig vom Vorliegen einer Sequestration, in veränderter Richtung weiterläuft.

Herniationen in cranio-caudaler Richtung durch Bruchstellen in der Endplatte werden als Intravertebrale Herniationen (Schmorl Knoten) referiert.

Umschlossen/ nicht umschlossen: verlagertes Material, welches von dem äusseren Anulus bedeckt wird als umschlossen bezeichnet, bzw. beim Fehlen einer Bedeckung durch den Anulus fibrosus als nicht umschlossen.

Morphologische Varianz unbekannter Signifikanz: Umstände, unter denen die Befunde eine abnormale Morphologie indizieren, welche jedoch nicht für eine diagnostische Klassifikation ausreichend sind.²⁸

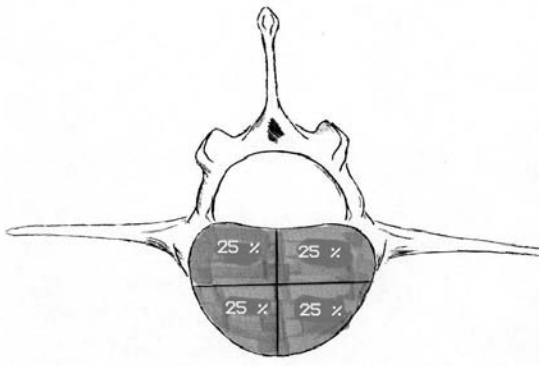


Abb. 1 Die Unterteilung der Bandscheibe in 4 x 25%

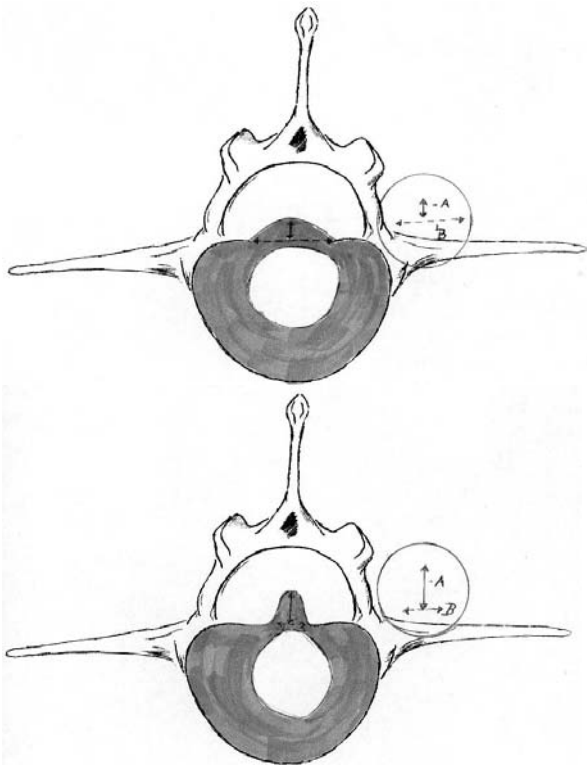


Abb. 2 Protrusion

Abb. 3 Extrusion

Gestrichelte Linie (B) : Basislinie

Durchgezogene Linie (A) : Distanz Basislinie-Diskusmaterial

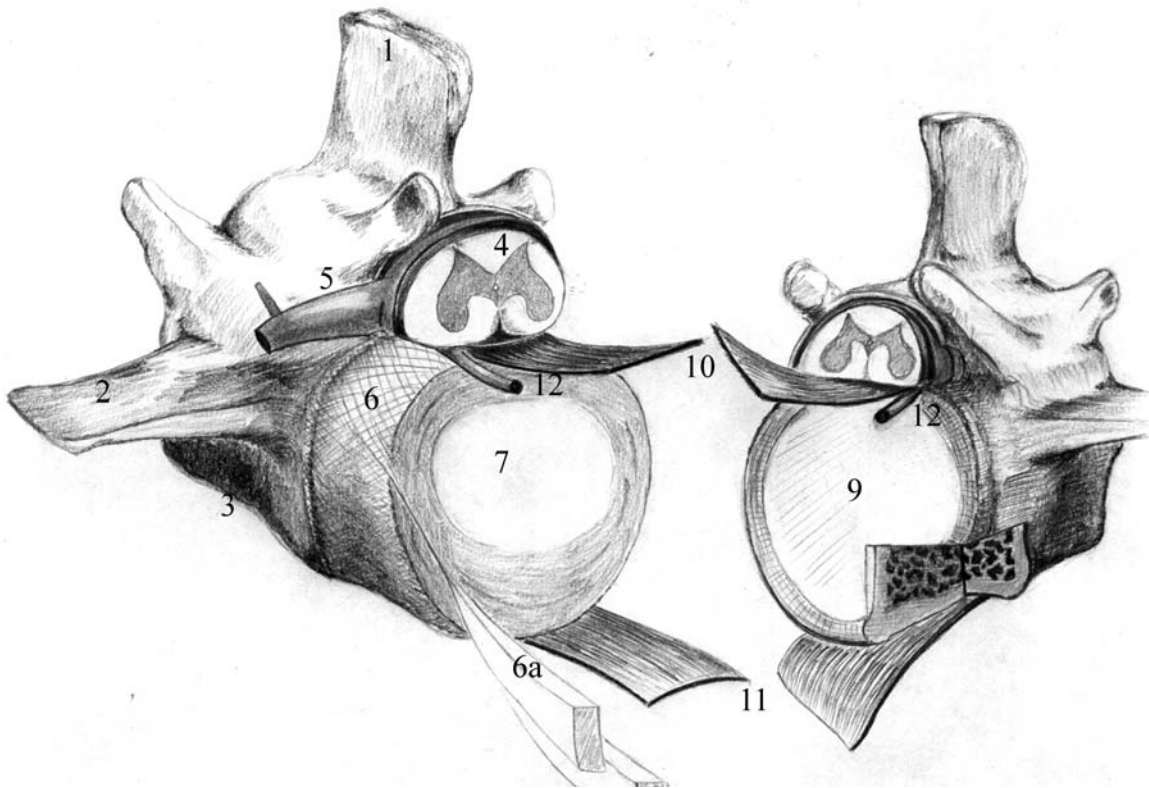


Abb. 4

1: Processus spinosus, 2: Processus transversus, 3: Corpus vertebrae, 4: Rückenmark, 5: Nervenwurzel, 6: Anulus fibrosus, 6a: Lamelle des Anulus fibrosus, 7: Nukleus pulposus, 9: Endplatte, 10: Ligamentum longitudinale dorsale, 11: Ligamentum longitudinale ventrale, 12: Epidurales Gefäß

Anatomie und Funktion der Bandscheibe (Diskus intervertebralis)

Die mit Ausnahme des Atlantoaxialgelenkes zwischen die Wirbelkörper gelagerte Bandscheibe schützt einerseits das Rückenmark, andererseits gewährleistet sie die Beweglichkeit der Wirbelsäule, sie stellt die größte avaskuläre Struktur im Organismus dar.

Der Nukleus pulposus, der Anulus fibrosus und die hyalinknorpelige Endplatte sind die Hauptanteile der dorsal und ventral vom Ligamentum longitudinale dorsale und ventrale begrenzten Bandscheibe.(siehe Abb. 4) Kollagene und Proteoglykane sind die primären strukturellen Komponenten des

makromolekularen Netzwerkes im Diskus intervertebralis. Kollagene verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit und Proteoglykane, die interaktiv mit Wasser wirken, verleihen dem Gewebe Steifheit und Widerstandsfähigkeit gegenüber Druckbelastung.¹²

Der zelluläre Anteil der Bandscheibe ist äußerst gering und liegt bei 1-5% des Gewebevolumens.³⁶

Der Nukleus pulposus (NP)

Der Nukleus pulposus stellt den mittig gelegenen gallertigen Kern im Anulus fibrosus dar.

Er ist ein Überrest des embryonalen Notochords, welches ein früher phylogenetischer Entwicklungsschritt der Wirbelsäule ist. Notochordzellen sind bis zur skeletalen Reife im NP nachweisbar. Weitere Zelltypen sind Chondrozyten, Fibrozyten und intermediäre Zellen.

Unter Druck-Relaxationsbelastung zeigt der Nukleus pulposus Flüssigkeitscharakter, bei dynamischen Belastungen Feststoffcharakter. Diese Eigenschaft wird als viscoelastisch beschrieben.⁶⁶ Der Wassergehalt variiert altersabhängig von 70- 88%, dabei wird er beeinflusst von einem hohen Anteil an hydrophilen Proteoglykanen (50 % des Trockengewichts), den Flüssigkeit ausschließenden Eigenschaften der Kollagene, sowie dem axialen Druck auf die Bandscheibe, welcher aus Körpergewicht als auch aus Muskel/Bänder Kräften resultiert.^{12, 62, 145} Die Proteoglykansynthese (Aggrekan stellt den Hauptanteil der Proteoglykane dar) ist im höheren Masse abhängig von der extrazellulären Osmolalität als von der makromolekularen Matrixkomposition.^{19, 68} Wobei *in vitro* NP zellen und AF zellen sich als äußerst langsam im Aufbau einer zell-assozierten Matrix erwiesen.¹⁹

Neben Proteoglykanen stellt Kollagen Typ II einen weiteren Hauptanteil dar, sowie die Kollagene VI, IX, XI.¹² Bei Beugung der Wirbelsäule verschiebt sich der Nukleus Pulposus innerhalb der Bandscheibe nach dorsal/posterior, bei Wirbelsäulenstreckung nach ventral/ anterior.²⁹

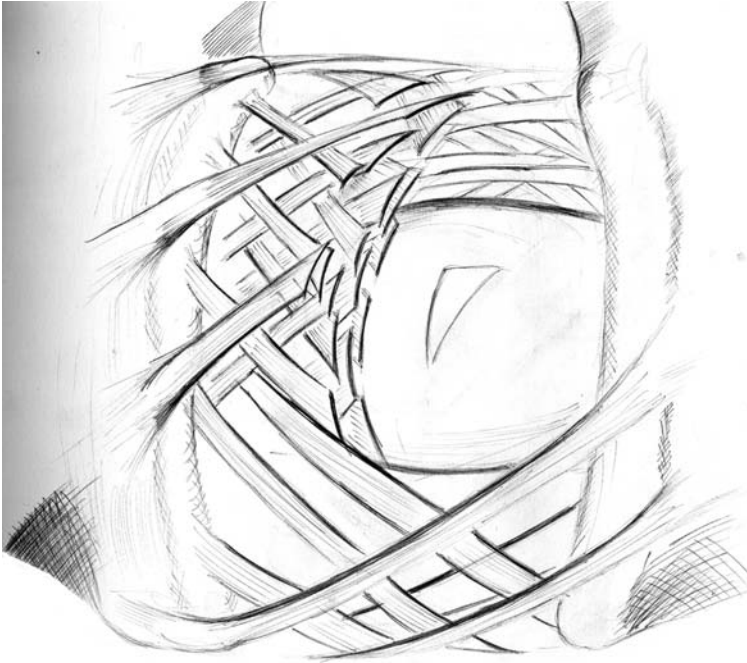


Abb. 5

Der Anulus fibrosus (AF)

Der Anulus fibrosus umfängt mit scherengitterartigen zueinander versetzten Lamellen den Nukleus pulposus. (siehe Abb. 5) Der ventrale und laterale Anteil sind 1,5 bis 3 mal dicker als der dorsale Anteil im lumbaren Bereich, so dass der Nukleus pulposus exzentrisch in den Anulus fibrosus gelagert ist. Es wird zwischen dem äußeren, aus Kollagenlamellen bestehenden, Anulus fibrosus, dem inneren, fibrocartilaginösen Anulus fibrosus und der dünnen, dem Nukleus pulposus angrenzenden, Übergangszone unterschieden. Die Übergangszone zeigt die höchste metabolische Aktivität und reagiert empfindlich auf physikalische, hormonelle und chemische Einflüsse.^{12, 62} Die mittleren Lamellen, welche die größte Proteoglykansyntheserate des AF aufweisen, verhalten sich steifer und sind weniger zugbelastbar.^{33, 145}

Beim Menschen wurden 15 bis 38 Lamellen gezählt, die Breite von innen nach Außen ansteigend variiert von 200 bis 400 µm.

Lichtmikroskopisch zeigen die einzelnen Lamellen keine Verbindung, so dass ein Gleiten der Lamellen übereinander bei Belastung ermöglicht wird.

Die inneren Lamellen strahlen in die Endplatte ein, die äußeren Lamellen verbinden sich mit der Wirbelepiphyse, wo sie als Sharpeyfasern weiterlaufen. Dabei nimmt ihr Einstrahlungswinkel von Außen nach innen ab. Der Anulus fibrosus zeigt hauptsächlich im dorsolateralen Anteil Unterbrechungen der Lamellen mit im Alter ansteigender Inzidenz.

Jede Lamelle besteht aus parallelen Bündeln von Fibrillen deren Breite von 10 bis 50µm variiert. Zwischen die Fibrillen gelagerte längliche, dünne bikonvexgeformte Fibrozyten, welche auch als spindelförmige Anulus Fibrosus Zellen beschrieben werden, sind der zelluläre Anteil des Gewebes. Das zelluläre Hauptprodukt ist Kollagen, welches 70% des Trockengewichtes ausmacht und dem Gewebe Widerstandsfähigkeit gegen Zugbelastung verleiht. Die Kollagentypen werden in eine fibrilläre Form und eine short helix Form unterteilt, ihre Verteilung variiert lokalisationsabhängig.⁶²

Fibrillär:

-Kollagen I stellt mit 80% des Gesamtkollagens den Hauptanteil dar, mit zum Zentrum abnehmender Konzentration. Antikörperfärbungen zeigten im Längsschnitt eine keilförmige Kollagen I Verteilung und im Horizontalschnitt eine ringförmige Verteilung mit einer anterioren Verbreiterung. Die Verteilung im äußeren Anulus fibrosus wurde als ein anterior verdickter „Donut“ beschrieben.¹⁵³

-Kollagen II liegt im inneren Anulus fibrosus, der Übergangszone und im Nukleus pulposus, wo es den Hauptanteil darstellt, vor.

-Kollagen III wurde an den Insertionsstellen (Endplatte und knöcherne Randleiste des Wirbelkörpers) und in der Peripherie nachgewiesen.

-Kollagen V liegt in geringer Menge (3%) im äußeren und inneren Anulus fibrosus vor.

-Kollagen XI liegt in geringer Menge (3%) im Nukleus pulposus vor

Short Helix:

-Kollagen VI liegt im Anulus fibrosus (ca.10%) und im Nukleus pulposus (ca. 15%) vor.

-Kollagen X wurde im beim juvenilen Diskus intervertebralis und bei Degeneration nachgewiesen.⁸

-Kollagen XI unter 2%.

Neben kollagenen Fasern wurden elektronenmikroskopisch noch elastische Fasern nachgewiesen, welche intralamellär in den oberflächlichen Lamellen des Anulus fibrosus dicht und regelmäßig arrangiert sind und sich in den tiefergelegenen Lamellen locker arrangiert darstellen. Interlamellär verlaufende elastische Fasern sind zwischen den oberflächlichen Lamellen vertikal und schräg verlaufend arrangiert. In tieferen Schichten zeigen sie einen rädären Verlauf und stellen sich in der tiefsten Schicht ein lockeres dreidimensionales Netzwerk von kollagenen und elastischen Fasern dar. Hohe Anteile von elastischen Fasern finden sich an den Insertionsstellen, wo sie als Sharpeyfasern den Wirbelkörper penetrieren.⁶²

Der intakte Anulus fibrosus ist nur in der Peripherie auf eine Tiefe von wenigen Millimetern durch freie Nervenendigungen innerviert, dabei weist der ventrale (anteriore) Anteil vergleichsweise mehr Nervenendigungen als der dorsale (posteriore) Anteil auf.^{140, 141}

Der Anulus fibrosus der cervikalen Wirbelsäule besteht nicht aus scherengitterartig angeordneten Schichten von Kollagenfasern wie der lumbare Anulus fibrosus, stattdessen liegt eine halbmondförmige Anordnung von Kollagenfasern vor, welche stark ausgeprägt im ventralen/anteriore Bereich sich in Richtung Processus uncinatus verjüngen. Dorsal/posterior liegt nur eine dünne Lage paramedianer vertikal orientierter Fasern vor.¹⁰⁸

Die hyalinknorpelige Endplatte (EP)

Die kraniale und kaudale Grenze des Diskus intervertebralis wird durch die hyalinknorpelige Endplatte geformt, welche die Epiphysen der Wirbelkörper bedeckt. Die hyalinknorpelige Endplatte hat 3 Hauptfunktionen: 1. Sie schützt den Wirbelkörper vor Druckatrophie durch den Nukleus pulposus. 2. Sie wirkt als partieller Absorber des hydrostatischen Druckes bei Belastungen. 3. Sie ist für

den Flüssigkeitsaustausch zwischen dem Nukleus pulposus sowie dem inneren Anulus fibrosus und dem Wirbelkörper verantwortlich.⁶²

Sie ist in der Peripherie maximal 1 bis 2mm dick und verjüngt sich in leicht konkaver Form zentralwärts, wo ihr der Nukleus pulposus direkt anliegt. Nur dieser zentrale, belastungsempfindliche Bereich weist eine Vaskularisation auf. Die Gefäße entspringen dem subchondralen Knochen und reichen bis zur Oberfläche der Endplatte, wo sie sich in Kapillaren aufzweigen. Die Kapillaren formen vaskuläre Knospen, welche im Bereich des Nukleus pulposus als geschwollene spirale Schleifen vorliegen und in im Bereich des inneren Anulus fibrosus einfache Schleifen formen, die Anzahl variiert dabei nicht.

Es wird vermutet das die Spiralschleifenform eine größere Oberfläche darstellt und somit eine höhere Permeabilität besitzt.¹³⁰ Die Ernährung und der Metabolitenabtransport des avaskulären Nukleus pulposus erfolgt einerseits über Osmose, hauptsächlich über die EP und in geringen Maße über den AF, andererseits über die belastungsabhängige Druck-Sog-Wirkung des Nukleus pulposus.⁶ Dabei ist nicht nur die Matrixkomposition der Endplatte von Bedeutung, sondern auch die Ladung, Form und Größe der gelösten Teilchen.¹⁵²

Degenerative Veränderungen der Bandscheibe

Degenerative Veränderungen der Bandscheibe, welche den Nukleus pulposus, Anulus fibrosus und die Endplatte umfassen, zeigen nicht nur Beeinträchtigung der einzelnen Struktur, sondern üben auch noch Einflüsse auf die angrenzende Struktur aus. Obwohl die Degeneration altersabhängig fortschreitet, ist sie jedoch nicht nur altersabhängig.¹²⁸

Familiäre Prädisposition als degenerative Ursache wurde in Zwillingsstudien belegt.^{7, 155} **Atherosklerotische Kalzifikation** der abdominalen Aorta begünstigt die Degeneration.^{78, 89}

Druckbelastung führt zur Disorganisation der Anulusfasern, Apoptosis, verminderter Kollagen II Expression,⁹⁷ Abnahme der Proteoglykane und Anstieg

des Kollagen I Anteils.⁶⁴ Dabei sind Belastungskraft und Belastungsdauer von Bedeutung.^{63, 96} Geringe Druckkräfte von 3 Atmosphären (Atm) wirken sich positiv auf die Proteoglykansynthese aus, höhere Belastung (30 Atm) wirkt sich negativ aus, dabei steigert der Druck die Matrix metalloproteinase 3 Produktion⁴⁷ und die Stickoxid Produktion, welches neben weiteren Mediatoren die Proteoglykansynthese hemmt.⁹³ Druckkräfte von beinahe 30 Atm werden bei Wirbelsäuleflexion in Kombination mit dem Heben schwerer Lasten erreicht.¹¹⁸ Im Gegensatz zur Flexion zeigt eine Hyperextension der Wirbelsäule bei einem Winkel von 20° für 20 Minuten einen positiven Effekt für die Rehydratation der Bandscheibe.¹⁰⁰

Die Degeneration ist gekennzeichnet von Proteoglykan- und Wasserverlust, Änderungen in Proteoglykan- und Kollagenzusammensetzung, Abnahme der Zellzahl und Änderungen in der Zellkomposition und der extrazelluläre Matrix,⁴¹ ansteigendem Kalzium und Phosphorgehalt,¹⁶⁴ Anstieg der Laktatkonzentration und pH-Abfall.¹¹⁷ Zusammenhangstrennungen des Anulus Fibrosus und verminderter Vaskularisation der Endplatte. Daraus folgen verminderte stossdämpfende Eigenschaften (Viskoselastizität) des Nukleus pulposus, verminderte Zugbelastbarkeit des Anulus fibrosus und eine verminderte Ernährung der Bandscheibe durch die Endplatte.

Degeneration des Nukleus pulposus

Der jugendliche Nukleus pulposus erscheint als eine fast durchsichtige opake Masse, welche sich deutlich vom inneren Anulus fibrosus unterscheiden lässt.⁸⁶ Im Laufe des Alterungsprozesses verfärbt er sich bräunlich und die Unterscheidung zwischen Nukleus und Anulus ist erschwert. Die braune Pigmentation resultiert zumindest teilweise aus einem Fluorophore welches an Lysin- und Hydroxylsyrückstände im Kollagen gebunden ist.

Die Zellzusammensetzung variiert altersabhängig. Im jugendlichen NP und innerem AF sind Chondrozyten predominant, im ausgewachsenen NP sind Fibrozyten häufiger vertreten. Die Zellen liegen in Chondronen zusammen und sind bis zur Hälfte nekrotisch.¹⁴⁵ Proteoglykanverlust und konsekutive Abnahme

des Wassergehaltes sind wesentliche Anzeichen der Alterung. Wobei nicht nur die Anzahl der Proteoglykane sondern auch die Molekülgröße abnimmt.

Weitere strukturelle und kompositionelle Veränderungen sind die Abnahme der mit Hyaluronsäure aggregierten Proteoglykane.^{12, 62} Anstieg des Verhältnisses von Keratan Sulfat zu Chondroitin Sulfat, Anstieg des Hyaluronsäureanteils.⁶²(Abb. 6) Eine Zunahme des Keratansulfatanteils in den Glycosaminoglykanen führt zu Ablagerungen von Amyloid in der Bandscheibe.⁵

Der Fibronectinanteil (ein extrazelluläres Glykoprotein) erhöht sich im Nukleus pulposus und im Anulus fibrosus, wobei 30-40% als Fragmente vorliegen.¹²⁹ Es wird bei der Alterung des NP zwischen 3 Matrix Turnover Phasen unterschieden:

Phase 1 (Wachstum) ist gekennzeichnet von aktiver Synthese von Matrixmolekülen und aktiver Denaturation von Kollagen II. Phase 2 (Reifung und Alterung) zeigt einen fortschreitenden Abfall der Syntheseaktivität und der Kollagen II Denaturation. Phase 3 (Degeneration und Fibrose) ist charakterisiert durch einen Mangel an Aggrekan- und Prokollagen II Synthese, sowie einer erhöhten Denaturation von Kollagen II und erhöhter Prokollagen I Synthese.⁴

Bei zunehmender Degeneration verliert der Nukleus pulposus die Viscoelastizität und weist Feststoffcharakter auf.⁶⁵

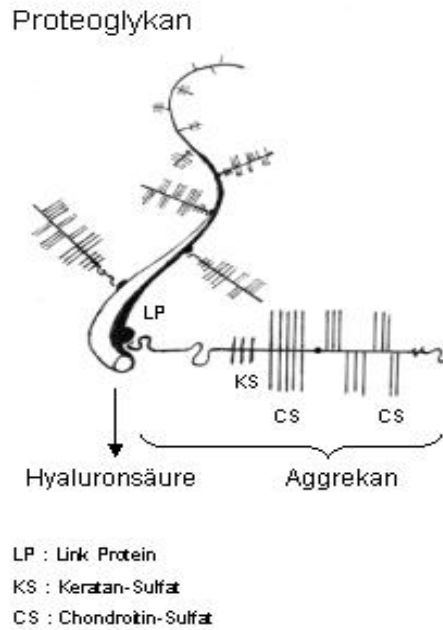


Abb. 6

Degeneration des Anulus fibrosus

Ein Verlust der als Zentraler Platzhalter fungierenden Proteoglykane des Nukleus pulposus führt zur Abnahme des Zwischenwirbelraumes, so dass der Anulus fibrosus sich über die Ränder der Wirbelkörper hervorwölbt, wobei das Hervorwölben auch ein Verhalten des AF bei Druckbelastung ist.^{12, 98}

Im Anulus fibrosus treten während des Alterungsprozesses mikrotraumatisch bedingte Risse auf¹³⁵.

Dabei wird zwischen schon früh auftretenden peripheren, konzentrischen und radiären Einrissen unterschieden (Abb. 7).¹³⁵

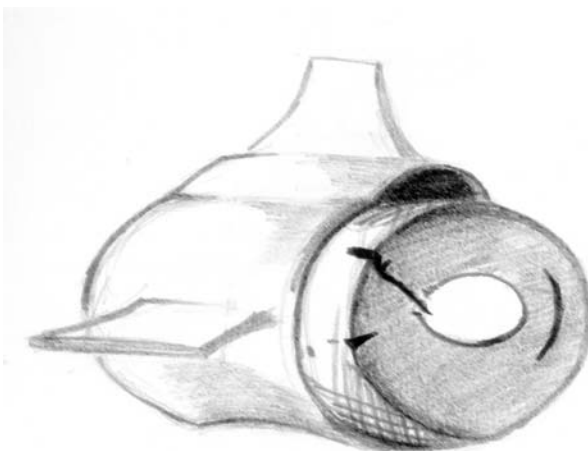


Abb. 7

Periphere Risse treten von L1-L2 bis L4-L5 hauptsächlich anterior auf, und sind zwischen L5-S1 anterior und posterior gleichermaßen vertreten.

Konzentrische Einrisse sind häufig mit peripheren Einrissen assoziiert, es wird vermutet das letztere die Entstehung begünstigen.

Radiäre Risse erscheinen fast ausschließlich posterior und sind mit Verlagerung des NP verbunden. Die Verlagerung stellte sich als Auswärtswölben der separierten AF Lamellen dar, mit Einwärtsfaltung der contralateralen Seite. Teilweise konnte Gefäßeinsprossung und Granulationsgewebe in den äußeren Lagen des eingerissenen AF beobachtet werden.¹³⁵

Experimentell peripher induzierte Einrisse zeigten nach einem Zeitraum von 6-8 Monaten deutlich folgende sekundäre Veränderungen:

- Degeneration des inneren AF;
- Degeneration des NP, definiert als Verlust der Abgrenzung zwischen NP und inneren AF, Dehydratation, Auftreten von Zusammenhangstrennungen und Verfärbungen;
- Annäherung des Zwischenwirbelraumes;
- Auftreten von Osteophyten.

Des weiteren zeigte nur der äußere AF eine Heilungstendenz.¹³⁴

Als Ursache für die ausbleibende Heilung des inneren Anulus fibrosus wird der Metabolismus Dermatan-Sulfat enthaltender Proteoglykane angenommen. Von Anulus Fibrosus Läsionen isolierte Zellen zeigten eine höhere Expression von Decorin und Biglykan. Diese an der Zelloberfläche exprimierten, kleineren Dermatan-Sulfat enthaltenden Proteoglykane hemmen die Kollagen I/ II Fibrillogenese, hemmen TGF β und vermindern die zelluläre Proliferationsrate.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Widersprüchlicherweise zeigten immunhistochemische Studien Decorin und Biglykan hauptsächlich am äußeren AF lokalisiert mit im Alter abnehmender Konzentration.³⁶

Radiäre und transverse Risse vergrößern die Bewegungsspannbreite hauptsächlich bei Rotationsbewegungen der Wirbelsäule.⁵⁵ Experimentell induzierte Risse zeigten Auswirkungen auf den subchondralen trabekulären

Knochen in Form von Knochenneubildung, welche bis zu 2 Jahre nachweisbar waren.¹¹⁴

Zwischen die Lamellen des AF lagert sich mucinöses Material, welches im weiteren Verlauf als kartilaginöses Gewebe darstellt (chondroide Degeneration)¹⁴⁵. Die spindelförmigen Anulus Fibrosus Zellen werden durch Chondrozyten ersetzt, wobei Basic Fibroblastic Growth Factor als Stimulus für die Chondrozyten vermutet wird.¹¹⁹

Der junge AF verhält sich anisotropisch, mit der größten Permeabilität in radiärer Richtung.⁶⁰ Mit zunehmender Degeneration nimmt diese Permeabilität ab bis ein fast isotropisches Verhalten erreicht wird.^{43, 44} Die Druck-Zug Belastbarkeit des degenerierten Anulus fibrosus nimmt um bis zu 30 % ab.³³

Degeneration der Hyalionknorpeligen Endpatte

Die Endplatte zeigt im Laufe des Alterungs- und Degenerationsprozesses Proteoglykan-, Kollagen- und Wasserverlust. Es werden entsprechend dem Nukleus pulposus 3 Matrix Turnover-phasen unterschieden. Phase 1

(Wachstum) ist gekennzeichnet von aktiver Synthese von Matrixmolekülen und aktiver Denaturation von Kollagen II. Phase 2 (Reifung und Alterung) zeigt einen fortschreitenden Abfall der Syntheseaktivität und der Kollagen II Denaturation. Phase 3 (Degeneration und Fibrose) ist charakterisiert durch eine erhöhte Denaturierung von Kollagen II und erhöhter Prokollagen I Synthese.³ Die Vaskularisation der EP nimmt ab bei einer verminderten Gewebepерmeabilität, ansteigender Kalzifikation und Änderungen der extrazellulären Matrixkomposition.³

Es wird dadurch nicht nur die Ernährung und Metabolitenabtransport.¹⁵² des NP eingeschränkt, sondern auch die strukturelle Integrität gefährdet. Bei einer verminderten Vaskularisation der Endplatte stellen die verbleibenden Überreste der Gefäße als Schwachstellen der Endplatte Routen für eine intravertebrale Herniation (Schmorl Knötchen) dar.¹⁸

Die kraniale Endplatte scheint beim Menschen empfindlicher zu sein als die kaudale Endplatte aufgrund des relativ geringeren trabekulären Knochenvolumens.¹¹²

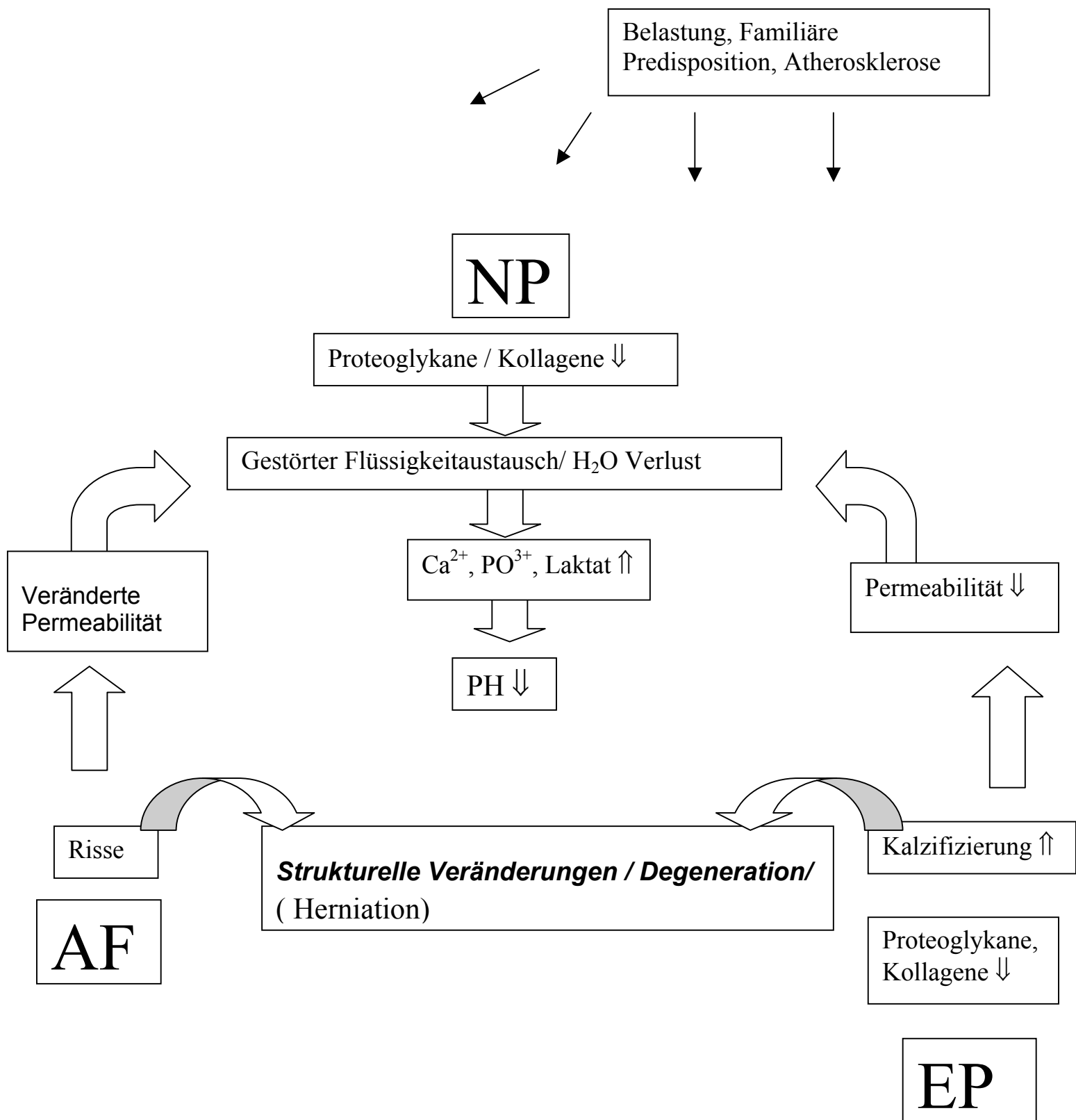
Matrixmetalloproteinasen (MMP) scheinen einen wesentlichen Einfluss, auf die Degeration zu haben und zeigen eine erhöhte Aktivität bei Herniationen.^{76, 151}

Matrixmetalloproteinasen sind Enzyme, welche die extrazelläre Matrix (Kollagene und Proteoglykane) abbauen. Die Subgruppe der Kollagenasen (MMP 1, 8, 13) spalten die Trippel-Helix-Struktur von fibrillären Kollagen (Typ I, II und III). Die resultierenden Fragmente werden durch Gelatinasen (MMP 2, 9) und durch Stromelysin (MMP 3) weiter degradiert. MMP 3 degradiert desweiteren Proteoglykane und Fibronektin.¹⁵¹

MMPs werden durch Fibronektinfragmente, Plasmin, IL-1 und TNF- α aktiviert bzw.angeregt.^{26, 36, 128}

Hemmung der MMPs erfolgt durch tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP), TGF- β , Prostaglandin E, IL-6, Epidermal Growth Factor, Fibroblastic Growth Factor, Kortikosteroide, Retinol (Vitamin A), α 2- Makroglobulin, Hydroxyaminsäure-Derivate, Tetracycline und Quinolone. Dabei läuft der die Aktivierung bzw. Hemmung direkt über Synthese einflüsse als auch indirekt über Plasmin und TIMP.³⁷

Eine Störung des Gleichgewichtes zwischen Matrix metalloproteinase 3 und dem Inhibitor of Matrix metalloproteinase 1, sowie die Matrixmetalloproteinasen 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13 wurden bei Bandscheibendegeneration und auch bei Herniation nachgewiesen.^{22, 74, 151} Bei Skoliose wurden die MMP 2 und 9 vermehrt auf der konvexen Seite nachgewiesen, welches einen Belastungseinfluss indiziert.²²



Der Bandscheibenvorfall / Herniation

Degenerative Veränderungen des Bandscheibengewebes vermindern die strukturelle Integrität der Bandscheibe und scheinen, das Herniationsrisiko zu steigern.¹² Ein Bandscheibenvorfall wird aber auch durch erhöhtes Körpergewicht, Rotations- und Kompressionskrafteinwirkung auf die Wirbelsäule und durch eine verstärkt zirkuläre Form der Endplatte begünstigt aus.⁵⁰

Das Risiko des Zerreißens des NP und damit einer Verlagerung in existierende anuläre Einrisse, ist stärker abhängig von Hydratationsstatus und Flexionswinkel als von der getragenen Last.¹⁵⁶ Wirbelsäulenflexion nach Ruhephasen, wenn der NP maximal hydriert ist, erhöht das Risiko für Rückenschmerzen.¹⁵⁷

Der erste Bandscheibenvorfall beim Menschen wurde 1824 beschrieben, wobei diese Veränderungen zunächst für Neoplasien gehalten wurden. 1932 wurde die wahre Natur des Bandscheibenvorfalls identifiziert. Veterinärmedizinische Berichte von Bandscheibenvorfällen beim Dackel folgten 1881.¹⁰

Das Lumbo-Sakralgelenk des Menschen weist die größte Bewegungsspannbreite auf^{30, 173} und zeigt eine ausgeprägtere Verminderung der Preoteoglykansynthese verglichen mit Bandscheiben der proximalen Lendenwirbel.¹⁶³

Beim Hund zeigt das Thorako-lumbale Gelenk eine besonders große Mobilität.¹⁰ Die meisten Bandscheibenvorfälle beim Menschen sind in der lumbo-sakralen Region lokalisiert, während sie beim Hund in der thorako-lumbaren Region lokalisiert sind.

Das bei Säugetieren stark entwickelte Ligamentum interkapitale verläuft zwischen den Rippenköpfen unter dem Ligamentum longitudinale dorsale. Es fehlt jedoch am 1., 12. und 13. Rippenpaar und ist nur schwach entwickelt am 11. Rippenpaar. Beim Menschen ist es nur rudimentär entwickelt. Die Präsenz dieses unterstützenden Bandes ist für die geringe Inzidenz von thorakalen Diskusherniationen beim Tier im Vergleich zum Menschen verantwortlich.⁹⁴

Sowohl der Hund als auch der Mensch zeigen hauptsächlich Herniationen in dorso-lateraler Richtung aufgrund des ventral verdickten AF.

Pathologisch-anatomisch wird hierbei unterschieden zwischen:

Herniation : Allgemein die Verlagerung des NP

Protrusion : Verlagerung des NP in den rupturierten AF

Prolaps : Verlagerung des NP durch den rupturierten AF bis zu den intakten Ligamenta longitudinalia

Extrusion : Verlagerung des NP durch den rupturierten AF und durch das rupturierte Ligamentum longitudinale

Bei vorgefallenem Material kann es sich um AF-, NP- oder EP-material sowie um Kombinationen derselben handeln, wobei 89% der Sequester NP material enthalten.¹¹³ Meist experimentelle Studien belegten, dass verlagertes Nukleus pulposus material folgende Veränderungen bewirkt:

Auswirkungen auf die spinalen Nervenwurzeln und das dorsale Ganglion in Form einer reversibel reduzierten Nervenleitgeschwindigkeit, welche das Maximum nach 7 Tagen und nach 1-2 Monaten wieder das Basalniveau erreicht.¹³⁷ TNF α wurde dabei als ausschlaggebender Faktor für die Reduktion nachgewiesen.^{67, 131, 132}

Des weiteren wurde Nervenfaserdegeneration, intrazelluläre Ödeme, erhöhter endoneuraler Flüssigkeitsdruck,¹⁷⁷ Ausdehnung des Schwann-Zell-Zytoplasmas, vesikuläre Schwellung der Schmidt-Lantermann Inzisuren,¹³² und ein Anstieg von Substanz P beobachtet,¹³³ wobei AF-inzisionen ohne verlagertes NP-Material ausreichend sind um die Nervenleitungsgeschwindigkeit zu reduzieren und eine Verletzung der Nervenfasern zu induzieren.⁸³

Eine Hyperalgesie durch an die Nervenwurzel verpflanztes NP-material wurde im Rattenmodell nachgewiesen. Eine induzierte Leukozytopenie zeigte im selben Versuch ein Ausbleiben der Hyperalgesie.⁸⁰ Eine erhöhte Menge an Entzündungszellen war positiv mit der Schmerzsymptomatik beim Menschen korreliert.¹⁷⁶ Neben diesen neuronalen Veränderungen wurde ein verminderter Blutfluss an der Nervenwurzel nachgewiesen.^{136, 137, 177}

Eine erhöhte Enzymaktivität von Phospholipase A₂ (PLA₂) kann direkt durch Reizung der Nervenendigungen, sowie indirekt durch die Produktion von Entzündungsmediatoren an der Schmerzentstehung beteiligt sein.³⁷

PLA₂ setzt Arachidonsäure aus der Zellmembran frei, aus welcher weitere Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene und Platelet-Activating-Factor gebildet werden. Ungesättigte Fettsäuren und Lysoderivate als weitere Produkte der PLA₂ können Membranzerstörung und Ödeme verursachen. Intraneuronale Mikroinjektionen von PLA₂ belegten ein neurotoxisches Potential in Form von Demyelination, Lipidakkumulation von degradierten Zellmembranen oder Myelin, sowie axonale Zerstörung.³⁷

Die **Zytokine** IL-1 α , IL-1 β , IL-6, Granulozyte-makrophage-colony-stimulating-faktor und TNF α wurden in Gewebeproben von Patienten mit ausgeprägter Schmerzsymptomatik nachgewiesen.^{77, 160}

In vitro Studien im Mausmodell bewiesen dass, proinflammatorische Zytokine (mit Ausnahme von TNF α) auch in Abwesenheit von Entzündungszellen von Bandscheibenzellen sezerniert werden.¹⁴⁷

Bei Extrusionen und Sequestern sind Histozyten, Fibroblasten und Endothelzellen die zytokinproduzierenden Zellen. Bei Protrusionen sind es hauptsächlich Chondrozyten.¹⁶⁰ Dabei waren die Konzentrationen von IL-6 besonders erhöht.⁷⁶

IL-1 stimuliert die Produktion von Matrixmetalloproteinasen, NO, IL-6 und PGE₂. Eine Blockade von NO bewirkte einen Anstieg von IL-6.⁷⁶

IL-1 α und TNF- α , welcher in NP-zellen nachgewiesen wurde, regen Histozyten, Granulationsgewebe bildende Zellen, zur Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) an.

Es liegen jedoch auch Studien über einen hemmenden Einfluss von TNF α auf die PGE₂ Produktion vor.¹⁶⁰

Der **PGE₂**-gehalt, sowie der Leukotrien B₄- und Thromboxan B₂-gehalt war in Herniationsmaterial mit Sequestern am höchsten und nahm von Extrusionen zu Protrusionen hin ab.^{77, 126, 127}

PGE₂ ist ein wichtiger Entzündungsmediator und spielt eine Rolle in der Schmerzentstehung durch Heruntersetzen der Schmerzschwelle der Nocizeptoren, Erhöhung der Ausfeuerungsrate der C-Fasern und eine erhöhte Sensivität gegenüber anderen schmerzproduzierenden Substanzen, wie Bradykinin, welches als eines der Hauptmediatoren spezifische Rezeptoren an der nociceptiven sensorischen Neuronen stimuliert.³⁷

Mit IL-1 β stimulierte AF zellen zeigten eine erhöhte Produktion von PGE₂ sowie eine erhöhte Sekretion von PLA₂.¹⁴⁸

Eine erhöhte **Stickoxid (NO)** Produktion von dem das Herniationsmaterial umgebende Granulationsgewebe und vom Herniationsmaterial direkt wurde nachgewiesen.^{54, 76} NO beeinflusst die Immunreaktion und hat paradoxe Effekte als Entzündungsmediator.

Proinflammatorisch wirkt es als Vasodilatator und erhöht die vaskuläre Permeabilität; antiinflammatorisch hemmt es die PGE₂, Thromboxane und die IL-6 synthese.³⁷

Studien mit monoklonalen Antikörpern belegten die Anwesenheit von **Immunglobulin (Ig) M** in 56% und von Ig G in 35% der Fälle.⁴⁵ Ig G wurde auch beim Hund nachgewiesen.

Eine erhöhte Expression von TGF- β und TGF- β Rezeptor positiven Diskuszellen wurde belegt.¹⁶⁵ TGF- β ist ein potenter Induktor der Angio- und Fibrogenese.

Neurovaskuläres Einwachsen in den AF wurde bei Herniationen und Stadien der Degeneration entlang der Ränder der AF-risse beobachtet^{30, 150}

Einsprossende Nerven enden dabei teilweise dicht an den Zellen der Bandscheibe. Als Endungen wurden Substanz P-Endungen, sympathische C-Peptid-Endungen und Neuropeptid Y-Endungen identifiziert.¹⁴¹ **Einsprossende Gefäße** zeigten eine Prävalenz von 91%, waren am ausgeprägtesten beim Vorliegen von Sequestern und lagen dabei dicht an den Bandscheibenzellen.^{71,}

¹⁶⁷

Als beteiligte Faktoren wurden Platelet-derived-growth-factor (PDGF) und Vaskular-endothelial-growth-factor nachgewiesen (VEGF).¹⁶⁶ PDGF zeigte

genau wie Insulin-like-Growth-Factor in vitro einen antiapoptotischen Effekt auf AFzellen.⁴²

Intravasal wurden dabei erhöhte Mengen von **Makrophagen** identifiziert.^{71, 167} Polymorphkernige **Leukozyten** wurden als erste erscheinende Zellen um Herniationsmaterial im Rattenmodell nachgewiesen.⁸⁰ Erst einige Tage später predominieren durch monocyte-chemotatic-protein angelockte Makrophagen.⁸¹

Im Falle einer Extrusion lagern sich diese an das Herniationsmaterial und führen zu einer erhöhten MMP 3 (Stromelysin)-Produktion.^{26, 49, 53} Inzisionen in den AF ohne eine Herniation des NP führten zu einer vergleichsweise geringeren Infiltration von inflammatorischen Zellen. Wobei T-Lymphozyten nach einer Woche und Makrophagen nach einem Monat signifikant erhöht waren.⁷⁵

Eine Neovaskularisation um vorgefallenes AF Material ist deutlicher ausgeprägt als bei vorgefallenem EP Material.¹⁶

Implantationen in die Kornea zeigten, dass der AF im Gegensatz zur EP Neovaskularisation induzieren kann.¹⁷

Doita et al.^{25, 26} schlugen vor, dass mononukleäre Zellen, welche entlang der Ränder des vorgefallenen Materials die Bandscheibe infiltrieren und inflammatorische Mediatoren produzieren, die Neovaskularisation induzieren. Nachgewiesen wurden in diesem Zusammenhang Anti-interleukin-1, intracellular adhesion molecule, lymphocyte function-associated antigen und basic fibroblast growth factor (b FGF). Letzterer zeigte wie andere Mediatoren eine erhöhte Expression in Abhängigkeit zur Oberfläche des exponierten Materials.

Im Zytoplasma der Bandscheibenzellen konnte eine erhöhte Expression von Fas-rezeptor nachgewiesen werden. Dieses, die **Apoptosis** induzierendes Protein, lag vermehrt bei nicht umschlossenen Herniationen (70%) gegenüber umschlossenen Herniationen (49%) vor.¹⁴³

Eine Herniation bewirkt neben oben beschriebenen Veränderungen, dass **anliegende Strukturen sekundär in Mitleidenschaft gezogen** werden. Der M. multifidus nimmt an der betroffenen Seite an Typ 1 (slow twitch) und 2 (fast twitch) Fasergrösse ab.^{180, 181} Je weiter lateral die Herniation erfolgt, desto mehr

Asymmetrie der Facettengelenke liegt vor.¹⁴² Die Durchblutung der ipsilateralen Extremität wird herabgesetzt.¹⁰¹

Die von Mixter und Barr 1932 postulierte Hypothese, dass vorgefallenes Material eine Kompression auf die Nervenwurzel ausübt scheint sich nach jüngsten Erkenntnissen nur teilweise zu bestätigen. Druckmessungen an der Nervenwurzel ergaben eine positive Korrelation zwischen Rumpfneigung und neurologischen Defiziten, jedoch keinen Zusammenhang zwischen Patientenalter oder Dauer der Symptomatik.¹⁶¹

Goupille et al.³⁷ beschrieben ein Modell für die Entstehung einer Radikulitis, bei dem ein unbekannter Faktor (evtl. biomechanischen Ursprungs) zu einer Störung des Gleichgewichtes zwischen Aktivatoren und Inhibitoren der Matrix degradierenden Enzyme führt. Dieser Prozess, verstärkt durch Zytokine führt zu einer Degradierung der Kollagen Matrix und Schwächung des AF und erlaubt somit die Herniation des NP.

Der NP provoziert eine Autoimmunreaktion und stimuliert die Produktion von inflammatorischen Mediatoren welche verstärkt durch Zytokine, wie IL- α und TNF α für radikulären Schmerz verantwortlich sind. Verlust oder Freisetzung von chemischen Substanzen aus der Bandscheibe führt zu einer Stimulation der kleinen nicht myelierten Nervenfasern im AF oder nahegelegenen neuralen Elementen, Erregung der Nocizeptoren und einer verstärkten Sensitivität gegenüber Substanzen wie Bradykinin.

Es wird dabei von einer transienten Entzündung ausgegangen, was erklären würde, dass einige Studien keine Entzündungsmediatoren nachweisen konnten^{20, 40, 59} Klinisch wird diese Theorie erhärtet durch die Tatsache dass viele Patienten nach 2 Monaten bei konservativer Therapie eine Besserung der Symptomatik zeigen,¹⁵⁴ sowie durch eine radiographisch nachweisbaren Rückgang des vorgefallenen Materials, wobei vor allem Herniationen mit Migration einen Größenabnahme zeigen.⁸³

Die autoimmune Reaktion wird erklärt durch die vom Immunsystem abgekapselte Lage des NP bzw. seiner Proteoglykane in der avaskulären Bandscheibe, so

dass vorgefallenes Material als körperfremd angesehen wird.³⁷ Gegen eine reine Autoimmunreaktion spricht jedoch, dass Immunglobuline nur in 35% (Ig G) bzw. 56% (Ig M) vorliegen und nicht in 100%, was anzunehmen wäre. Des weiteren zeigen Reherniationen keine verstärkte Reaktion, welches nicht auf die zu erwartende Bildung von T-Memory Zellen schliessen lässt.⁷⁹

Failed Back Surgery Syndrome/ Postdiskektomiesyndrom

10 bis 30% der Patienten klagen über postoperative Rückenschmerzen. Ein erneuter chirurgischer Eingriff ist in 5 bis 33 % der Fälle nötig, in Abhängigkeit von der Operationstechnik.³¹

Reinterventionsraten in Abhängigkeit von der Operationstechnik : ³¹

Standardtechniken	10-30%
Diskektomien	5 –18%
Mikrochirurgische Zugänge	7 – 15%
Perkutane Methoden	14 –33%.

Eine postoperative Schmerzsymptomatik ohne eine beschwerdefreie Zwischenperiode ist meistens auf Fehler in der Operationsmethode zurück zu führen. Eine wiederkehrende Schmerzsymptomatik wird durch pathologische Prozesse verursacht.

Ursachen für unveränderte postoperative Schmerzsymptomatik: ³¹

Operation am falschen Segment
Unzureichende Entfernung von vorgefallenem oder degenerativ verändertem Diskusmaterial
Nicht erkannte zweite Herniation
Traumatisierung der Nervenwurzel
Übersehene verlagerte Sequester
Unzureichende Dekompression der spinalen Stenose

Andere Ursachen (Tumore, Spondylolisthesis, Extravertebrale Nervenkompression, Polyneuropathie)

Ursachen für wiederkehrende postoperative Schmerzsymptomatik : ³¹

Wiederkehrende Herniation am selben Segment (Reherniation) Neue Herniation an einem anderen Segment Epidurale Fibrose, lokale Arachnoiditis (Diskektomy Syndrom) Symptomatische Arthritis der kleinen intervertebralen Gelenke (Facetten-Syndrom) Sekundäre spinale Stenose Instabilität Spondylitis oder Spondylodiskitis

Die Kurzzeitergebnisse (unter 2 Jahren) im Falle einer Revisionschirurgie führen zu zufriedenstellenden Ergebnissen in 80%. Langzeitergebnisse (2 bis 27 Jahre) zeigen eine Abnahme der zufriedenstellende Ergebnisse (22%).

Die Zeit zwischen der ersten Operation und der Reintervention reicht von 6 Stunden bis 28 Jahre (durchschnittlich 3 Jahre). Eine durchschnittliche Periode von 3 Jahren liegt auch zwischen ersten und zweiten Reintervention vor. Bei weiteren Reinterventionen verkürzt sich dieser Zeitraum auf 2,2 Jahre und schließlich auf 15,5 Monate. Die Inzidenz einer lokalen Arachnoiditis steigt dabei von anfänglich 5% auf 50% bei einer vierten Reintervention. Die Instabilität steigt von 12% auf 50 %, ohne dass eine Korrelation zur Anzahl der Dekompressionen in der primären Operation vorliegt. Epidurale Fibrose wurde in 44% der Fälle bei der ersten Reintervention nachgewiesen, auch im Zusammenhang mit wiederkehrenden Herniation. Laminektomien führten in 96% zu einer zweiten Operation, Hemilaminektomien in 19%. Im Falle von wiederholten Operationen ergaben Wirbelkörperfusionen bessere Ergebnisse als andere Techniken.³¹ Mit jeder wiederholten Operation steigt das Risiko einer Duraperforation, da epidurale Fibrose und Narbengewebe die Operation verkomplizieren.¹⁶⁹

Die Epidurale Fibrose ist in der Pathogenese nicht vollständig geklärt. Narbengewebe bildet sich über einen Zeitraum von 6 Wochen bis 6 Monate postoperativ, als Stimulus werden dabei Abriebpartikel von Kompressen vermutet. Eine Schmerzsymptomatik ist nicht unbedingt mit den MRI befunden vereinbar.²¹

Die Reherniation

Ein wiederkehrender Bandscheibenvorfall am operierten Segment zur ipsi- oder zur kontralateralen Seite wird als Reherniation bezeichnet.

Die Reherniation ist neben epiduraler Fibrose eine der Hauptursachen für eine erneute chirurgische Behandlung bei Bandscheibenvorfällen.²¹ Rückenschmerzen während Husten sprechen für eine Reherniation.⁷³ Die Inzidenz der Reherniation beträgt dabei 3-11% und die Mehrheit der Reherniationen erscheint auf der ipsilateralen Seite.^{2, 159} Es werden dabei 2 Typen unterschieden. Die frühe Reherniation tritt innerhalb des ersten Jahres nach der Operation auf, hierbei verlagert sich weiteres Diskusmaterial. Die späte Herniation (> 2 Jahre) ist gekennzeichnet von der Verlagerung von Diskusmaterial und fibrocartilaginösem Gewebe, welches als Reparaturgewebe den Operationsdefekt ausfüllt.² Histologisch liegen Chondrozyten mit einer fibrillären interzellulären Matrix (Granulationsgewebe) vor, eine perichondrale Kalzifizierung zeigte sich in 50%.⁹⁰ Der Reparaturprozess erfolgt von der Peripherie des AF ins Zentrum des Diskus.

Risikofaktoren für eine Reherniation sind junges Alter, männlich, Rauchen und Trauma.^{159, 179} Der Konsum von Wein begünstigt die Prognose bezüglich der Schmerzempfindung.¹⁴⁹

Reherniationen treten 1 bis 10 Jahre nach der initialen Operation auf, wobei das Hauptrisiko 1-3 Jahre postoperativ vorliegt.⁵⁶

In vitro Studien bewiesen das Bandscheibenzellen nach der Herniation eine Proliferationsaktivität zeigen und somit ein regeneratives Potential. Im Falle einer Reherniation blieb die Proliferationsaktivität aus.¹³⁸

Diskusdegeneration beim Hund

Beim Hund wird rasseabhängig zwischen einen **hypochondroplastischen** (ehemals chondrodystrophisch) und einen **nicht-hypochondroplastischen** (ehemals nicht-chondrodystrophischen) Typ unterschieden.

Der **hypochondroplastische Typ**, wie er beim Dackel (45-70 % der Fälle), Pekinese, Beagle, Lhasa apso und Cocker Spaniel vorkommt, ist gekennzeichnet von früh auftretenden degenerativen Veränderungen.

Diese als chondroide Metaplasie beschriebenen Veränderungen, welche mit Kalzifizierung des NP einhergehen, betreffen bis zu 60-70 % der Bandscheiben bei Hunden in einem Alter von 2 Jahren.

Der Kollagenanteil ist hierbei von Geburt an relativ erhöht und steigt bis auf 25 % im NP von 11 Monate alten Tieren.

Die Proteoglykane zeigen dabei eine verminderte Aggregationstendenz und der Keratan-Sulfat-Anteil steigt relativ zum Chondroitin-Sulfat-Anteil in einem Alter von 2 Jahren. Diese Tiere zeigen zwischen 3-6 Jahren neurologische Symptome in Form eines akuten Einsetzens, welches als Hansen Typ 1 beschrieben ist.

Der **nicht-hypochondroplastische Typ** zeigt eine langsame Degeneration, welche nur einzelne Bandscheiben betrifft, wobei sich der mukoiden NP langsam fibrotisiert (fibröse Metaplasie) und Kalzifizierung nur selten auftritt.

Erste mikroskopische Anzeichen der Alterung oder Degeneration sind eine erhöhte mitotische Aktivität, hauptsächlich in der perinukleären Region mit folgender erhöhter metabolischer Aktivität, wobei Kollagen das Hauptprodukt ist. Die neugeformten Kollagenfasern reichen bis in das Zentrum des NP, wo sie sich mit der Zeit verdicken und die NP-zellen umschließen.^{9, 168}

Bei nicht hypochondroplastischen Rassen persistieren die Notochordzellen bis ins Erwachsenenalter.¹

Herniation beim Hund

Die Bandscheibe des **nicht hypochondroplastischen Typ** zeichnet sich durch eine geringfügige Versteifung aufgrund eines erhöhten Kollagengehalts des Nukleus pulposus aus, ohne dass signifikante degenerative Veränderungen bei der Mehrheit der Hunde gesehen werden. Im Falle einer degenerativen Veränderung werden Traumen als Initiator angesehen. Hauptsächlich Torsionskräfte im Zusammenhang mit Kompressionsbelastung führen zu einer Separation der äußeren Anuluslamellen. Die damit verbundene eingeschränkte Absorption von Zug- und Scherkräften überträgt sich auf den Nukleus pulposus. Der Nukleus pulposus reagiert auf diese veränderte Biomechanik mit Modifikationen in der Zellpopulation. Letztendlich stellt sich dieses zelluläre Remodelling als eine Unterteilung des NP in einzelne Lobuli, aufgrund von Invasion (oder Proliferation) von fibrocartilaginösen Septen, die zwischen den Zellgruppen verlaufen. Im weiteren Verlauf der Degeneration des NP treten Nekrose, zellulärer Tod und Kalzifikation, sowie auch eine progressive Fibrose auf. Während Kompressionsbelastung ist der steifere NP nicht mehr in der Lage mit einem ausreichenden Schwellungsdruck entgegenzuwirken und Anteile der Belastung werden auf die Fasern des AF übertragen. Die Fasern des AF sind für eine solche Belastung nicht ausgerichtet und degenerieren folglich. Eine weitere biomechanische Belastung der Bandscheibe führt zu einer kompletten Zerreißung des AF mit dem Austritt von fibrotischen NP material in dorsaler oder dorso-lateraler Richtung. Typischerweise zeigt diese Herniation ein langsames Auftreten mit milder klinischer Symptomatik. Hansen beschrieb diesen Herniationstyp als **Hansen Typ 2**. Typ 2 Herniationen können grundsätzlich bei jedem geriatrischen Individuum auftreten. Sie sind die Typischen Herniationen beim Menschen, Katzen und vielen anderen Spezies. Neben einem langsamen Auftreten mit milder Symptomatik stellen sich diese Herniationen vergleichsweise kleiner mit regelmäßiger, glatter Oberfläche dar. Blutungen und durale Adhäsionen sind selten bei diesem Herniationstyp.

Im Gegensatz dazu steht der von **Hansen** als **Typ 1** beschriebene Herniationstyp. Typ 1 Herniationen stellen sich als akutes Auftreten mit ausgeprägter Symptomatik dar. Der Vorfall ist explosiv und kann bis zur Hälfte den Wirbelkanal ausfüllen. Die Oberfläche stellt sich uneben dar, Blutungen und durale Adhäsionen sind häufig. Der Typ 1 kommt hauptsächlich bei hypochondroplastischen Hunden und chondrodystrophischen, zwergwüchsigen Menschen vor. Jüngere Studien belegten das Auftreten von Hansen Typ 1 Herniationen bei großen, nicht hypochondroplastischen Hunden.²⁴ Bandscheiben von **hypochondroplastischen** Hunden zeichnen sich durch einen von Anfang an verminderten Proteoglykan- und erhöhten Kollagengehalt aus, so dass die hydraulischen Eigenschaften stark eingeschränkt sind. Die morphologischen Veränderungen der Bandscheibe stellen sich ähnlich dar wie bei nichthypochondroplastischen Hunden treten jedoch viel früher auf und Erkenntnisse über eine Separation der Anuluslamellen liegen nicht vor. Fibrokartilaginöse Septen, welche den Nukleus in einzelne Lobuli unterteilen, wurden bei 2 Monate alten Tieren nachgewiesen. Im Alter von einem Jahr führt Chondrozytenproliferation zur histologischen Erscheinung von Knorpel, die Zellen liegen dabei in einzelnen Lakunen vor und sind palisadenartig angeordnet. Im weiteren Verlauf zeigen fokale Gebiete im NP eine verstärkte Degeneration mit zellulärer Nekrose, Desintegration der interzellulären Substanz und Kalzifikation. Die Foci vergrößern sich und fließen schließlich zusammen, so dass die zentrale chondroide Region des NP von einem Graben aus kalzifizierten Gewebe umgeben ist. Diese schwachen biomechanischen Eigenschaften führen zu einer Mehrbelastung und Zerreißung des AF, wobei große Teile des kompakten NP vorfallen und anliegendes Gewebe schädigen können.⁹

Studien am Beagle (hypochondroplastische Rasse) zeigten das Hunde unter 2 Jahren bei NP Verpflanzung keine histologisch nachweisbare Entzündung zeigen, so dass obwohl morphologische Veränderungen schon frühzeitig vorliegen, von einem weiteren Alterseinfluss ausgegangen wird. Eine Verpflanzung von AF-material allein bewirkte keine entzündliche Reaktion.⁵²

Reherniationen beim Hund

Der Terminus Failed Back Surgery Syndrom wird in der veterinärmedizinischen Literatur nicht verwendet. Der Begriff „Rezidiv„ wird ohne einheitliche Definition benutzt und beschreibt meistens die wiederkehrende Symptomatik, dabei werden Rückenschmerzen beim Hund je nach Autor mit in die Symptomatik aufgenommen.⁸² Die Fenestration der Bandscheibe reduziert das Risiko eines Rezidives. Nach einer Fenestration der Bandscheibe über einen ventralen Zugang wurde von einer wiederkehrenden Symptomatik bei 24,4 % (Rückenschmerzen mit eingeschlossen) bzw. 9,4 % (Rückenschmerzen ausgeschlossen) berichtet.⁸² Andere Studien geben eine Rezidivrate von 1.5 % bei Hemilaminektomien¹²² und 4.5% - 19 % nach Fenestrationsen über einen ventralen Zugang.^{23, 120} Eine Vielzahl der Fälle verbessert sich bei konservativer Therapie. Im Falle einer erneuten Operation lagen Bandscheibenvorfälle hauptsächlich an anderen Segmenten vor.^{23, 82, 120} Eine Studie von 500 Fällen zeigte eine Reoperationsrate von 6.4%, wobei eine Reherniation (Vorfall von Bandscheibenmaterial am operierten Segment zur ipsi- oder contralateralen Seite) in 1.8% vorlag.²⁴ Eine prophylaktische Fenestration anliegender Bandscheiben reduziert das Risiko eines Rezidives,¹⁰⁴ führt jedoch zu Instabilität des Zwischenwirbelraumes.⁹⁹

Fenestration der Bandscheibe in der Humanmedizin

Grundsätzlich kann bei Behandlung von Bandscheibenvorfällen zwischen einer konservativen Therapie und einer operativen Therapie unterschieden werden. Die konservative Therapie umfasst medikamentöse Behandlung mit Kortikosteroiden, lokalen Anästhetika und Akupunktur. Das Ziel einer operativen Behandlung ist die Dekompression des Rückenmarks. Dabei kommen Laminektomien, Hemilaminektomien, Chemonukleolyse, Durotomien, Myelotomien, Wirbelkörperfusionen und Fenestrationsen zur Anwendung. Der Einsatz des in dieser Studie getesteten Bandscheibenersatzstoffes Annular Sealant Device (siehe Seite 37) bezieht sich

auf die Fenestration, so dass im Folgenden nur auf diese Technik eingegangen wird. Eine Fenestration in Bandscheibenchirurgie ist die Inzision des Anulus fibrosus über einen dorso-lateralen, lateralen oder ventralen Zugang, hierbei werden kreuzförmige, rechteckige oder zirkuläre Techniken verwendet.⁸² Zirkuläre Inzisionen haben die geringsten Auswirkungen auf die Biomechanik, Kreuzinzisionen haben die meiste Auswirkung auf die Biomechanik.¹²¹ Unterschiedliche Inzisionstechniken zeigen Einfluss auf Stärke des heilenden Gewebes.² Die partielle Entfernung des Nukleus pulposus zeigt bessere klinische Ergebnisse hinsichtlich verminderter Rückenschmerzen und zeigt radiographisch eine verminderte Abnahme der Diskushöhe und gewährleistet somit die intervertebrale Stabilität.^{111, 121} Dieses Procedere birgt jedoch die Gefahr, dass weitere Teile des Nukleus pulposus vorfallen (Reherniation). Fetttransplantate vermindern den Grad an duralen Narbengewebe, wirken sich jedoch nicht auf das radikuläre Narbengewebe aus.⁷²

Die künstliche Bandscheibe

Verglichen mit den Fortschritten in der Kniegelenks und Hüftprothetik steckt die Bandscheibenprothetik noch in den Kinderschuhen.

Nach Bao et al.⁶ sind zwei Typen der Prothetik möglich: ein Ersatz des NP und des AF und ein Ersatz des NP allein. Ein alleiniger Ersatz des AF, wie in der vorliegenden Studie wird nicht erwähnt. Anforderungen an die Prothese sind ein Ersatz der natürlichen Bandscheibendynamik, Bioverträglichkeit, eine sichere und einfache Implantationstechnik und eine feste Verbindung zwischen dem Implantat und dem Gewebe. Eine Einteilung der Prothesen des NP und des AF erfolgt nach ihren Ausgangsmaterialien in Metallprothesen, Nichtmetallprothesen und Kombinationen aus beiden. Metallprothesen zeichnen sich durch eine hohe Belastungsfähigkeit und eine gute Bioverträglichkeit aus. Ein Erhalt der natürlichen Flexibilität der Wirbelsäule wird jedoch bei Metallprothesen aus einer Komponente bestehend nicht erreicht. Modelle aus mehreren Komponenten wurden entwickelt (siehe Abb. 8), jedoch besteht bei diesem Modell die Gefahr des Einwachsens von fibrotischem Gewebe, welches die Mechanik der Prothese

nachhaltig beeinflussen würde. Kurzzeitstudien im Schafmodell konnten kein Einwachsen von fibrotischen Gewebe nachweisen; Langzeitstudien liegen nicht vor.⁸⁵ Ein anderer Nachteil von Prothesen aus Metall ist die Entstehung von Abriebpartikeln.

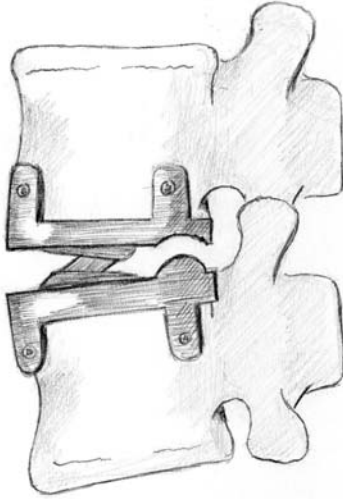


Abb.8

Nichtmetallprothesen aus Polymeren oder Elastomeren (Silikone, Polyurethane) besitzen mechanische Ähnlichkeiten zur natürlichen Bandscheibe, erweisen sich jedoch als schwierig in der Entwicklung von längerfristig belastbaren Prothesen. Verschiedene Modelle versuchten dabei die Anatomie und Biomechanik genaustens mit in Betracht zu ziehen und bestanden oftmals aus mehreren Komponenten. In Betracht gezogen wurden auch gentechnisch hergestellte, resorbierbare Fasern aus Proteoglykanen.

Kombinationen aus Metall- und Nichtmetallprothesen sollen die Vorteile beider Ausgangsstoffe (lange Belastbarkeit und Flexibilität) vereinen. Häufig wurden dabei Metall-Polymer-Metall Sandwichmodelle verwendet. In die humanklinische Anwendung kamen dabei 2 Modelle. Das LINK S Charite weist die längsten klinischen Studien auf und besteht aus 2 konkaven Endplatten aus einer Kobalt-Chrom Verbindung. Die Platten besitzen Spikes um an den Wirbelknochen fixiert zu werden. Zwischen den Platten liegt ein Stück bikonvex geformtes Polyethylen. (Abb. 9)

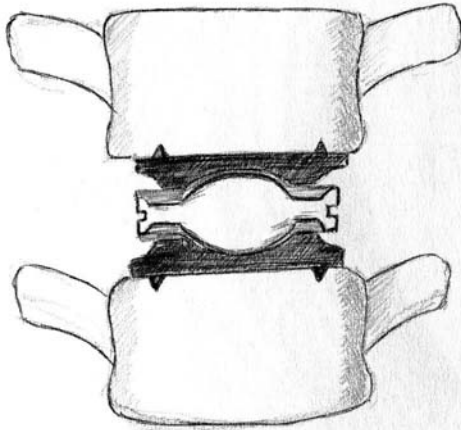


Abb. 9

In einer retrospektiven Studie konnte nach einer durchschnittlichen Periode von 11.9 Monaten ermittelt werden, dass 20 % der Patienten eine Aufhebung der Schmerzsymptomatik zeigten, 40-50 % berichteten von Schmerzreduktion, 6-9 % klagten über gesteigerte Schmerzen und 3 % erforderten eine erneute Operation. Eine von Steffee entwickelte Prothese kam in den USA in die klinische Anwendung und besteht aus einer Polyolefin Gummihülle, welche an 2 Titanplatten vulkanisiert ist. Die Fixation an die Wirbel erfolgt durch eine poröse Übersichtung, die ein Einwachsen des Knochens ermöglicht und durch 4 konische, 7mm hohe Erhebungen, die in den Knochen hineinragen(siehe Abb. 10). Bei einer Anwendung an 6 Patienten versagten 2 Implantate durch Brüche an der Gummihülle.

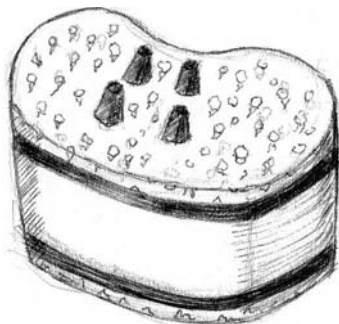


Abb. 10

Nukleusprothesen haben den Vorteil, dass sie weniger invasive Chirurgie erfordern und eine Wiederherstellung des AF bezüglich der Faserlänge und Spannung ermöglichen. Die Anwendung limitiert sich jedoch auf Frühstadien der

Bandscheibendegeneration, wenn der AF noch weitgehend intakt ist.

Anwendung fanden hauptsächlich Silikon, aber auch bioresorbierbare Stoffe, z.

Bsp. Hydrogele, die ein Einwachsen ermöglichen sollen. Hou

entwickelte einen Silikon Nukleusersatz in Hufeisenform, der nach Studien am Affenmodell bei 30 Patienten implantiert wurde. Retrospektive Studien über den klinischen Erfolg liegen jedoch nicht vor.

Von den 3 Prothesen, die in die klinische Anwendung kamen, liegen nur von Hou Tierstudien vor, die auf einer Anzahl von 4 Tieren basieren. Weder die Link S Charite noch Steffee referieren Vorstudien im Tiermodell.⁶

Viele Bandscheibenimplantate liegen der EP direkt an, dabei beeinflussen sie nicht nur die Diffusion, sondern führen auch zum Bruch der EP in der zentralen, weniger belastungsstarken Region.³⁸

Annular Sealant Device (ASD)

O' Donnell konnte nachweisen dass ein hoher PGE₂ -Gehalt mit Extrusionen und Sequestern assoziiert war und ein niedrigerer PGE₂ -Gehalt bei Protrusionen vorlag. Er vermutete, dass ein intakter AF vor PGE₂ als Stimulus vor der Degradierung schützt.¹²⁷

Das in dieser Studie untersuchte Biomaterial wird im Anschluss an die Fenestration und die Diskektomie in den Anulusdefekt injiziert, um einen weiteren Vorfall von Nukleusmaterial zu verhindern. Des weiteren soll eine Instabilität ausgeglichen werden, ohne dass die Ernährung der Bandscheibe durch die Endplatte beeinflusst wird.

Annular Sealant Device (ASD) ist ein Prototyp der ersten Generation. Das Biomaterial basiert auf einem *in-situ* trocknenden, viskoselastischen, biokompatiblen Polymer. Nach dem Mischen der voll-synthetischen Komponenten erhält man eine niedrig visköse Emulsion mit einer guten Gewebsbenetzbarkeit. In der flüssigen Phase fügt sich das Biomaterial in den Gewebsdefekt des Anulus Fibrosus. Die Aushärtungszeit beträgt 3 Minuten. Es

folgt ein Trocknungsprozess, der das Material innerhalb von 20 Minuten in eine weiße, viskoselastische Masse umwandelt. Während dieser milden, exothermen Reaktion werden Maximaltemperaturen von 41 ° C erreicht, die das umliegende Gewebe nicht beeinflussen. Nach 4 Stunden besitzt das Material 70 % seiner Belastungskapazität. Das Maximum der Belastungskapazität wird nach 72 Stunden erreicht.

Das verfestigte ASD – Implantat ist eine nicht resorbierbare, bioinerte, vernetzte Versiegelung des Anulus Fibrosus.⁴⁶(Abb. 11.1-11.3)

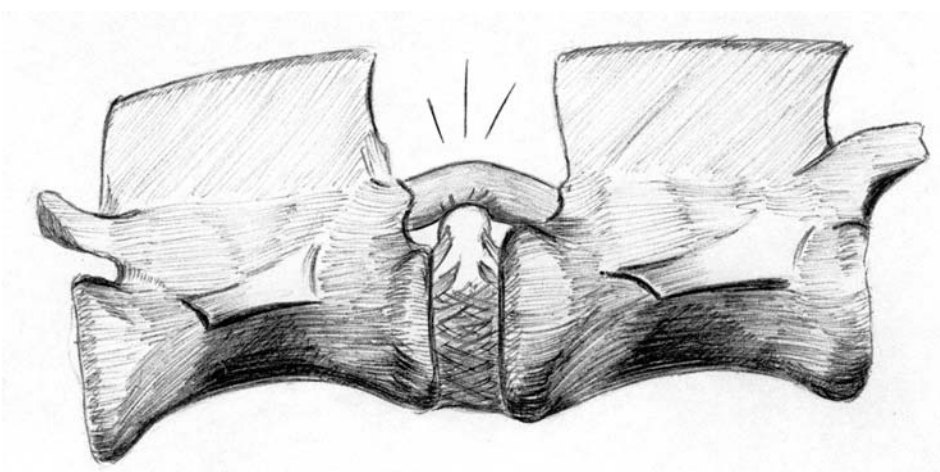


Abb. 11.1, Herniation

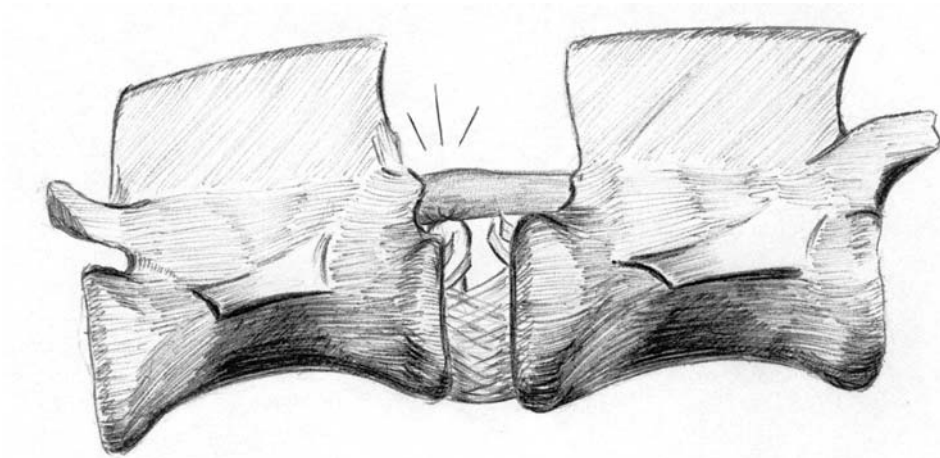


Abb.11.2, Reherniation

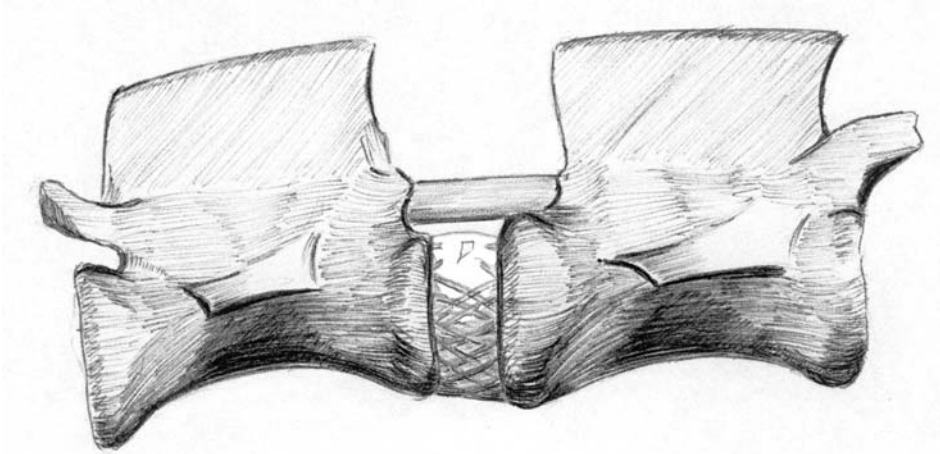


Abb. 11.3, Versiegelung des Anulus fibrosus mit Annular Sealant Device

! Die Facettengelenke sind in den Abb. 11.1 bis 11.3 nicht dargestellt, um die Auswirkungen der Bandscheibe auf das Rückenmark zu verdeutlichen. !

Entzündungsmediatoren

Als Nachweis einer entzündlichen Reaktion wurden in dieser Studie unter anderem Entzündungsmediatoren detektiert. Dabei wurden sowohl systemische Mediatoren (die Zytokine Interleukin-1 und Interleukin-6, sowie Tumor Nekrosis Faktor α) als auch lokale Mediatoren (Prostaglandin E_2 und Stickoxid (NO)) in Betracht gezogen.

Systemische Mediatoren

Interleukin-1 (IL-1)

Interleukin-1 liegt in 2 Isoformen als Interleukin-1 α und Interleukin-1 β vor. Diese Peptide zeigen dabei eine Homologie in der Aminosäuresequenz von nur 30 % mit unterschiedlichen Isoelektrischen Punkten.¹⁷¹ Die biologische Aktivität ist jedoch sehr ähnlich. Die Molekülmasse der aktiven Form beträgt 17-19 kDa.^{34, 171} Für beide Isoformen liegen unterschiedliche Rezeptortypen vor. Rezeptortyp 1 ist ein 80 kDa Glykoprotein aus der Überfamilie der Immunglobuline, welches hauptsächlich bei T-zellen, Fibroblasten, Hepatozyten, Endothel- und Epithelzellen vorliegt.^{34, 35, 171} Der Rezeptortyp 2 liegt mit einer molekularen Masse von 68 kDa hauptsächlich bei B-zellen, Makrophagen und Neutrophilen vor. Der Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) bindet an beide Rezeptoren.¹⁶²

Ein second messenger für Interleukin 1 wurde bislang nicht nachgewiesen. Mit Ausnahme von Erythrozyten und T-Lymphozyten wird IL-1 von beinahe jeder Zelle produziert.¹⁷¹

Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 ist ein modifiziertes Phosphoglykoprotein mit einer im Vergleich zu Interleukin-1 größeren Molekülmasse von 26 kDa.^{88, 115} Interleukin-6 wird von einer Vielzahl von Zelltypen produziert, wie zum Beispiel Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Tumorzellen, normale und neoplastische Zellen, ebenso wie Chondrozyten und osteoblastische Zelllinien.^{58, 69} IL-6 stimuliert die Funktion, Replikation und Differenzierung von Immunzellen (B-Zellen).^{88, 95}

Zytokine wirken im Organismus endokrin, parakrin, juxtakrin oder autokrin.^{103, 109} IL-1 stimuliert dabei, allein oder in Kombination mit TNF α oder Lipopolysacchariden, die Produktion von Matrix Metalloproteinasen, sowie Entzündungsmediatoren wie NO und PGE2, bzw. deren für die Synthese wichtigen Enzyme iNOS (inducible nitric oxide synthase) oder Cox-2 (Cyclooxygenase-2).^{13, 57, 61, 70} Auch chemotaktische Effekte auf Lymphozyten konnten nachgewiesen werden.¹¹⁰ IL-1 und IL-6 sind beteiligt an pathologischer Knochenresorption, wie z.B. bei tumorösen Erkrankungen, renaler Dystrophie, Pagetsche Krankheit, Osteoporose aufgrund von Östrogenmangel, sowie bei periodentalen Erkrankungen und Zahnzysten. In Chondrozyten und in Osteoblasten stimuliert IL-1 die IL-6 Synthese. Für einen IL-1 induzierten Abbau der Proteoglykane scheint IL-6 als weiterer Faktor benötigt zu werden.^{103, 124} Jedoch auch ein Anstieg der TIMP in Chondrozyten konnte nach Stimulation mit IL-6 beobachtet werden, welches einen protektiven Effekt von IL-6 indiziert.¹²³ In equinen Gelenkknorpel verändert IL-1 die Sulfatierung von neu synthetisierten Proteoglykanen, lässt jedoch ausgereifte Proteoglykane unberührt.¹⁰³

IL-1 und IL-6 werden nicht kontinuierlich produziert, sondern reagieren auf endogene oder exogene Stimuli. IL-1 wird stimuliert durch Trauma, Komplement Komponenten, die humorale Immunantwort, extrazelluläre Matrixkomponenten

(Proteoglykane und Kollagene), andere Zytokine, Thrombin, Strahlung, Kalzium und bakterielle Produkte (Lipopolysaccharide).¹⁶²

IL-6 wird stimuliert durch den lokalen Effekt von IL-1 und TNF α , sowie systemisch durch Parathyreoid Hormon (PTH), PTH related Protein und 1,25 Dihydroxicalciferol (Vitamin D) sowie PGE₂.^{95, 115, 144}

T-supressor Zellen sind an einer Hemmung von IL-1 durch natürliche Killerzellen beteiligt.¹⁷² Parallel zu einer erhöhten PGE 2 Produktion steigt der Gehalt des natürlichen Inhibitors von IL-1 mit einem Molekulargewicht von 6-9 kDa.¹⁷²

Neben dem IL-1ra, welcher im Hundemodell einen chondroprotektiven Effekt auf das Kreuzband zeigte, hemmen auch TGF β , IGF, INF den Effekt von IL-1.^{15, 92, 103, 115, 162}

IL-4 hemmt eine IL-1 induzierte MMP-stimulation.

Calcitonin und geringfügig auch Indomethacin hemmen die IL-6 induzierte Knochenresorption.⁶⁹

Tumor Nekrosis Faktor α (TNF α)

TNF α ist ein Mediator von Entzündungs- und Immunreaktionen, dabei reguliert er Wachstum und Differenzierung einer Vielzahl von Zelltypen. Eine selektive Zytotoxizität gegenüber transformierten Zellen zeigt sich besonders in Kombination mit Interferon γ . Viele Aktionen von TNF α treten in Kombination mit anderen Zytokinen auf. TNF α wird exprimiert als ein Typ II Membran Peptid von Monozyten, Makrophagen, sowie einer Vielzahl anderer Zellen, einschließlich B-Zellen, T-zellen und Fibroblasten. Die Tertiärstruktur von TNF α zeigt dabei Ähnlichkeiten zur sogenannten „Jelly roll“, wie sie auch bei einigen Pflanzen und tierischen Viruskapsiden vorkommt. Es liegen zwei Rezeptortypen (Typ I und Typ II) vor, welche sowohl TNF α als auch TNF β binden. Die geringe Homologie der Rezeptoren (unter 25%) indiziert unterschiedliche Signaltransmission. Der TNF-Rezeptor ist in nahezu allen Zellen präsent mit Ausnahme von Erythrozyten und T-Zellen im Ruhestadium. Der Typ II Rezeptor liegt dabei hauptsächlich bei hämapoetischen Zellen vor. Eine lösliche Form des Rezeptors wurde in der Humanmedizin bei Krebspatienten im Blut und im Urin nachgewiesen. Es wird

vermutet, dass die lösliche Form als Inhibitor agiert. $\text{TNF } \alpha$ aktiviert die Sphingomyelinase, welches zu einer Aktivierung der Mg^{2+} abhängigen Proteinkinasen führt. Des weiteren aktiviert $\text{TNF } \alpha$ die Phospholipasen D und A2. Typ I und Typ II Rezeptor wirken dabei evtl. unterschiedlich in der zellulären Antwort über unterschiedliche Signaltransmission.¹⁴

Lokale Mediatoren

Prostaglandin E_2 (PGE_2)

Prostaglandine bestehen aus einem Cyclopentanring. Wobei unterschiedliche Wirkungspotenzen der Prostaglandine auf die strukturellen Unterschiede der Ringform und in geringerem Masse auch auf die Anzahl der gesättigten Bindungen zurückzuführen ist. Das hochpotente Prostaglandin E besteht aus einem β Hydroxy-Keton Ring.

Die Synthese von Prostaglandinen geschieht über den Cyclooxygenase-Weg, wobei 2 wichtige Enzyme involviert sind. Die Phospholipase A2 (PLA 2) setzt Arachidonsäure aus der Phospholipidschicht der Zellmembran frei. Die Cyclooxygenase auch Prostaglandin G/H Synthetase genannt, wandelt Arachidonsäure in Prostaglandinperoxide um.^{87, 103, 170} Es liegen 2 Isoformen der Cyclooxygenase (COX) vor. Die COX 1 wird kontinuierlich hauptsächlich in Osteoblasten produziert als Reaktion auf IL-1 oder cAMP induzierende Substanzen. Die COX 2 wird von einer Vielzahl von Agenzien schnell und nur vorübergehend stimuliert. COX 2 scheint für erhöhte PGE_2 Konzentrationen verantwortlich zu sein.⁸⁷

Indomethacin und Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID) hemmen die Cyclooxygenase durch irreversible Acetylierung. Kortikosteroide hemmen die Phospholipase A2. Hyaluronsäure reduziert *in vitro* die PGE_2 Konzentration.¹⁷⁸

PGE_2 erhöht den intrazellulären cAMP Spiegel und steigert somit die Syntheseaktivität der Zelle.^{51, 125} Man vermutet dass PGE_2 über den Adenylcyclase Rezeptor Proteinkinasen aktiviert.⁵¹ Analog zu dem erhöhten cAMP Spiegel treten erhöhte Kalziumspiegel im Blut auf. Es wird angenommen, dass PGE_2 synergistisch wirkt mit 1,25 Dihydrocalciferol. PGE_2 und auch NO

hemmen in bovinen Knochen die Proteoglykansynthese. In niedrigen Dosen stimuliert es die Kollagensynthese im Knochen, in hohen Dosen hemmt es die Kollagensynthese. PGE₂ zeigte einen stimulatorischen Effekt auf MMPs und, erhöht die vaskuläre Permeabilität.^{70, 125}

Stickoxid (NO)

Stickoxid (NO) ist ein kleines Molekül welches aus der Aminosäure L-Arginin und molekularem Sauerstoff mit NADPH als Cofaktor durch eine Familie von Enzymen genannt Stickoxid-Synthetasen synthetisiert wird.¹¹⁶

Stickoxid-Synthetasen (NOS) gehören zur Gruppe der Flavoproteine. Es wurden 2 Klassen mit Isoformen identifiziert. Die konstitutive Form (cNOS) beinhaltet als Isoformen die endotheliale NOS und die neuronale NOS. cNOS produziert in Abhängigkeit von Kalzium und Calmodulin schnell und vorübergehend kleine Mengen von NO. Sie wird gehemmt durch Chelatbildner. Die induzierbare Form (iNOS) produziert nach einer Verzögerungsphase von 6 Stunden hohe Mengen von NO und fällt dann auf ein tieferes Aktivitätsniveau. Sie ist Kalzium und Calmodulin unabhängig und wird nicht durch Chelatbildner gehemmt, wohl aber mit Ausnahme in Chondrozyten durch Glukokortikoide. cNOS wurde im Endothel, in Thrombozyten und in neuronalem Gewebe nachgewiesen. iNOS liegt in Makrophagen, Hepatozyten, Synoviozyten, Chondrozyten Osteoblasten und Osteoklasten vor. iNOS wird aktiviert durch Endotoxine (Lipopolysaccharide der Zellwand von E. coli) oder durch Entzündungsmediatoren, wie IL-1 β , TNF α , Interferon δ , Leukemia inhibiting faktor. Die Enzymaktivität wird einerseits durch die Quantität andererseits durch die Stimulation mit Interleukinen limitiert.^{27, 116} Strukturanaloge zu Arginin (wie z.B. N- Monomethyl-L-Arginin, u. a.) können beide Klassen der NOS hemmen. IL-4, IL-10 und TGF β hemmen genauso wie Glukokortikoide die NO-synthese, wobei Glukokortikoide jedoch nicht in Chondrozyten wirken.¹³⁹

NO ist ein multifunktionelles inter- und intrazelluläres Messenger Molekül, welches für seine Aktivität keinen Rezeptor benötigt. Stickoxid gehört zur Gruppe der freien Radikale, welches Atome oder Moleküle sind die ein oder mehrere

ungebundene Elektronen besitzen. Stickoxid (NO) reagiert hauptsächlich mit Sauerstoff, Superoxid und Eisen enthaltende Substanzen, wie Hämoglobin und Myoglobin.^{27, 102} Neben der kurzen Halbwertszeit von 2-10 Sekunden limitiert die hohe Affinität zu Hämoglobin den Effekt von NO. In Abwesenheit von Sauerstoff bindet NO an das zentrale Eisenatom des Hämoglobins und formt einen stabilen Nitrosylkomplex. Das Endprodukt des NO ist Nitrit oder Nitrat. Beides sind Zwischenprodukte im Oxidationsprozess von L-Arginin zu Citrullin.^{27, 102, 158} NO führt durch Aktivierung der Guanylat Cyclase zu erhöhten intrazellulären cGMP-spiegeln. Dieses bedingt eine Abnahme des freien Kalziums und führt zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen. Gefäße dilatieren demzufolge und der Blutdruck sinkt.^{11, 123} Außerdem ist NO beteiligt an der Plättchenaggregation und reguliert die Kontraktilität des Herzmuskels. Im zentralen Nervensystem ist es als Neurotransmitter beteiligt an Gedächtnis und Motorfunktionen. Im peripheren Nervensystem ist es beteiligt an der Relaxation des Gastrointestinaltrakts, der Blase und des Corpus cavernosum. Makrophagen, Blut-Monozyten, neutrophile Zellen, Lymphozyten und Chondrozyten produzieren durch die induzierbare Stickoxidsynthetase (iNOS) NO bei Abwehrreaktionen, immunologischen Reaktionen und beim septischen Schock.¹¹⁶ MMP s, welche Kalzium für ihre Aktivierung benötigen, werden ebenfalls durch NO negativ beeinflusst.^{32, 84, 175} NO hemmt des weiteren Eisen enthaltende Enzyme wie sie in Mitochondrien vorkommen, so dass die Zelle auf anaerobe Glykolyse umschaltet, was zu erhöhten Laktatspiegeln führt, da NO auch noch die Glyceraldehyd -3-Phosphat-Dehydrogenase hemmt. Auch werden die für die DNA Synthese wichtige Ribonukleotid Reduktase gehemmt, so daß die Zellproliferation gemindert wird. Eine Rolle von NO im Zusammenhang mit anderen freien Radikalen, welche Zellmembranen, Enzyme und die DNA schädigen können, ist noch unklar. Neben einem hemmenden Effekt auf die DNA-, Proteoglykan- und Kollagensynthese, induziert NO die Apoptose von Chondrozyten und reduziert in hohen Konzentrationen die Synthese von IL-1ra.¹⁴⁶ Außerdem stimuliert NO TNF α , so daß, allgemein ausgedrückt, NO matrixdegradierende Zytokine stimuliert. Es zeigt jedoch einen negativen Effekt auf die PGE₂ und IL-6 synthese.

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction oder PCR) erlaubt mit Hilfe des Enzymes DNA-Polymerase spezielle DNA-Abschnitte (z.B. Gene, Genteile) in weniger als zwei Stunden mehrere hundertmillionenmal zu verdoppeln.

Alle DNA-Polymerasen synthetisieren DNA nach demselben Prinzip der Basenpaarung (A+T, C+G). Adenin paart sich immer mit Thymin und Guanin immer mit Cytosin. Die DNA-Polymerasen benutzen je einen Strang der DNA Doppelhelix, indem sie von den vier aktivierten (phosphorylierten) Basen Adenin, G., T., und C. die Richtige auswählen und sie nach der oben erwähnten Basenpaarregelung aneinanderketten. Aus einer einzelsträngigen DNA entsteht somit eine doppelsträngige DNA. Damit die DNA -Polymerase weiss, wo sie beginnen soll, braucht sie einen Verankerungspunkt, den man als Primer bezeichnet. Dieser ist in der Natur meistens ein kurzes Ribonukleinsäure(RNA)-Stück. *In vitro* genügt als Primer ein kurzes DNA-Stück, das man als Oligonukleotid bezeichnet. Die DNA-Polymerasen synthetisieren nur in der 5'→3' Richtung an einer Matrizen-DNA. Die Synthese stoppt, sobald das Enzym das Ende der Matrize erreicht hat. Danach sucht es einen neuen Verankerungspunkt (Primer) und die DNA-Synthese läuft wieder in der 5'→3' Richtung ab.

Ablauf: Durch Erhitzen auf 95°C werden zuerst die beiden DNA-Stränge denaturiert, das heisst, in zwei Einzelstränge zerlegt. Danach wird die Temperatur auf 45-50°C gesenkt. Nun gibt man Primer- Oligonukleotide dazu, die eine kurze bereits bekannte Basensequenz des gesuchten DNA-Abschnitts enthalten. Enthält ein einziges der DNA-Moleküle eine Basenreihenfolge, die derjenigen des gesuchten Stückes komplementär ist, so paart es sich mit ihm. Somit ist eine Startstelle für die Polymerase entstanden. Als nächstes wird die Polymerase dazugegeben und die Reaktionstemperatur auf das Syntheseoptimum der DNA-Polymerase gebracht. Nach Ablauf der Synthese

werden beide Stränge wieder bei 95°C denaturiert, bei 45-50°C wird der Primer wieder anhybridisiert und bei der dritten Temperatur (Synthesetemp.) synthetisiert die DNA-Polymerase die nächsten Stränge. Die totale Reaktion dauert 3-4 Minuten. Dieser Ablauf konnte 1988 automatisiert werden durch die DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (=Taq DNA Polymerase). Es übersteht den Hitzeschritt bei 95°C problemlos. Somit ist keine kontinuierliche Zugabe des Enzyms mehr notwendig. Ein automatisiertes Wasserbad, das periodisch den Wechsel der drei Temperaturen (95°C für Denaturierung der DNA, 45-50°C zum Neuanhybridisieren der Primer und 75°C für die DNA-Synthese durch die hitzestabile Taq DNA-Polymerase) computergesteuert ausführt, kann in 2-3 Stunden 40 solcher Zyklen ausführen.⁶²

Prinzip der Real time PCR

Zusätzlich zu den Primern forward / reverse wird eine Nukleotidsequenz der zu replizierenden DNA hinzugefügt. Diese Sequenz, auch als TaqMan Probe bezeichnet besitzt fluoreszierende Eigenschaften (Reporter) am 5' Ende und einen sogenannten Quencher (engl.:Einfänger) am 3'Ende. Eine Eigenschaft von Molekülen in Abhängigkeit der Grösse ist, daß innerhalb des Moleküls Energien ausgetauscht werden. Die TaqMan Probe als kleines Molekül gibt somit ihre Fluoreszenz nicht frei. Wenn die Polymerase die DNA von 5' zum 3'Ende repliziert baut sie die TaqMan Probe ab, und die Fluoreszenz wird messbar freigesetzt. Bei der Real Time PCR werden die Replikationszyklen gemessen bis ein definierter Fluoreszenzwert erreicht wird. Die Messung wird als CT-Wert angegeben. Ein hoher CT Wert bedeutet, dass relativ viele Zyklen benötigt wurden und somit eine geringe Ausgangsmenge an zu replizierender DNA vorlag. Da die Menge der Gewebeprobe nicht homogen ist wird der CT-Wert korrigiert. Dabei bedient man sich eines housekeeping gens, welches immer gleichmässig exprimiert wird. Dieses housekeeping gen ist proportional zur Probenmenge. Der korrigierte CT Wert wird als ΔCT angegeben.^{62 91}

Material und Methode

Ursprünglich geplant war eine postoperative Periode von 3, 6 und 9 Monaten. Neben einer Analyse mittels Real-Time PCR sollte Immunhistologische Untersuchungen des Rückenmarks aller Tiere erfolgen. Nach den unzufriedenstellenden Zwischenergebnissen nach 3 und 6 Monaten erfolgte die Schlachtung der verbleibenden Tiere so schnell wie möglich. Auch unterblieb einerseits aus Kostengründen, andererseits aufgrund der 3 und 6 Monate Resultate eine weitere Immunhistologie. Die postoperative Periode ergibt sich damit als 3, 5, 6, 7 und 9 Monate. Immunhistologische Untersuchungen liegen nur von der 3 und 6 Monate Gruppe vor.

Präoperatives Procedere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um eine Gruppe von 25 weiblichen Schafen der Rasse Weisses Alpenschaf. Die Tiere waren zwischen 2 und 4 Jahren alt, das Durchschnittsalter betrug 3,28 Jahre. Das Gewicht lag zwischen 47 und 78 Kg (im Durchschnitt 59,3 Kg.)

Beim Ankauf erfolgte eine Untersuchung der Tiere auf allgemeinen Gesundheitszustand, Trächtigkeit und Klauenzustand, sowie eine Blutentnahme zur Untersuchung der Parameter entsprechend Anhang 1. Die antiparasitäre Behandlung erfolgte mit Doramectin 0,2 mg/kg i.m. (Dectomax[®], Pfizer AG, Zürich, Schweiz) nicht tragend diagnostizierte Tiere erhielten 2x im Abstand von 14 Tagen Luprostiolum 0,5 ml i.m. (Prosolvlin[®], Verterinaria AG, Zürich, Schweiz.)

24 Stunden präoperativ wurde das Tier gewogen und die Fütterung wurde unterlassen, die Wasseraufnahme blieb ad libitum.

Das Tier wurde unilateral am Hals für den venösen Zugang und im Bereich des Operationsgebietes entsprechend *Abbildung 12* geschoren. Die

Körpertemperatur wurde rektal gemessen. Ein intravenöser Katheter (Angiocath 1.7 x 83 mm, 6 Ga x 3, Provet AG, Lyssach, Schweiz) wurde in die Vena jugularis eingeführt und mit Einzelknopfheften an der Haut fixiert.

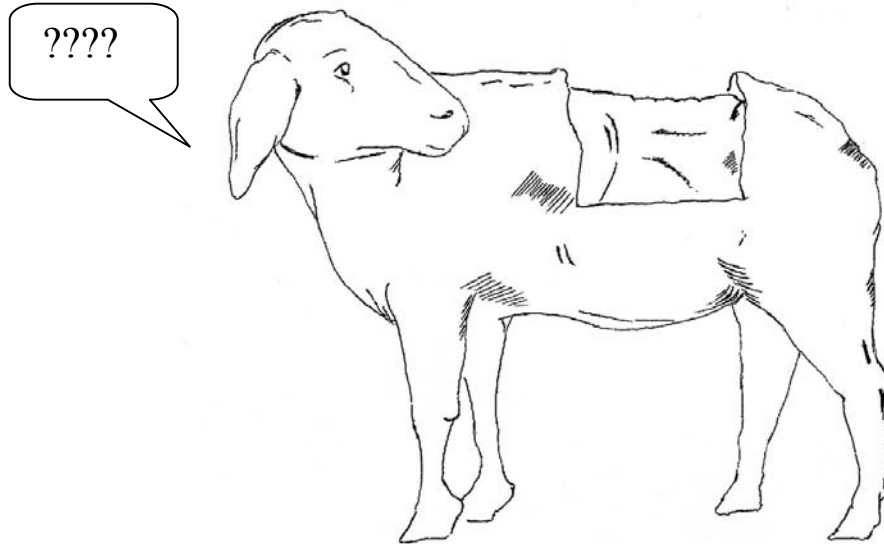


Abb.12

20 Minuten praeoperativ wurde Tetanusantitoxin serum, 500 i.E./Tier s.c., (Tetanuserum, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz;), das Analgetikum Carprofen, 4mg/kg s.c., (Rimadyl, Pfizer, Vertrieb Dr. E. Gräb AG, Bern, Schweiz) sowie die Antibiotika Penicillin G, 30.000 i.E./kg i.v., (Hoechst AG, Frankfurt-Deutschland) und Gentamycin, 6mg/kg i.v. (Streuli&Co. AG, Zürich, Schweiz) verabreicht.

Die Praemedikation erfolgte mit Medetomidine, 10 µg/kg i.m. (Domitor®, Orion Animal Health, Finnland). Die Narkose wurde mit Ketamin 2 mg/kg (Narketan® 10, Chassot) eingeleitet und gegebenenfalls mit Propofol 1% ,2-4 mg/kg i.v., (Fresenius Kabi AG, Schweiz) vertieft. Nach laryngo-trachealer Intubation wurde die Anaesthesie mit einem Isofluran/Sauerstoffgemisch erhalten.

Der Tierkörper wurde in Seitenlage auf einer Vakuummatraze mit geringgradiger Neigung nach ventral und konvexer Aufbiegung der Wirbelsäule gelagert. (Abb. 13)

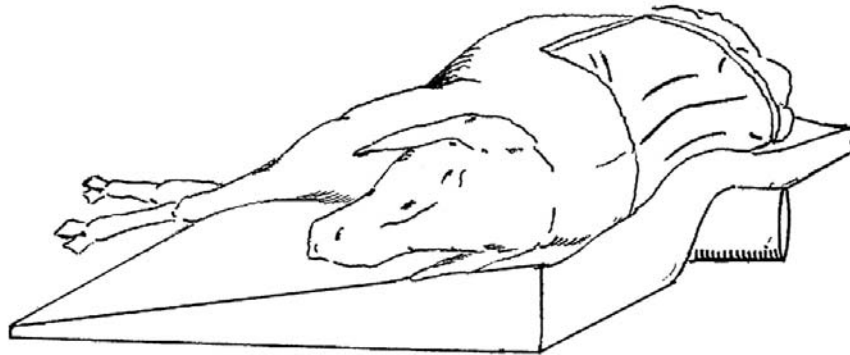


Abb. 13

Das Operationsgebiet wurde mit Hibiscrub™-Seife (Zeneca AG, Luzern, Schweiz) 3x gewaschen, nachfolgend 3x mit Alkohol (70%) entfettet und abschliessend mit Hibitanspray (Zeneca AG, Luzern, Schweiz) besprüht.

Der Operative Zugang für die Implantation des Annular Sealant Device zwischen den Lendenwirbeln 2 und 3

Bei der Kontrollgruppe, 9 von 25 operierten Tieren, unterblieb die Implantation des Annular Sealant Device.

Nach steriler Abdeckung des Operationsgebietes wurde die Haut mittig zwischen den Processi spinosi und den Processi transversi vom letzten thorakalen Wirbel bis zum fünften Lendenwirbel inzidiert. Die Fascia trunci superficialis wurde durchtrennt, der darunter liegende M. longissimus dorsi wurde stumpf durch Zug nach dorsal vom M. multifidus separiert. Der M. longissimus dorsi und die Fascia trunci superficialis wurden mit einem Langenbeckhaken auseinander gehalten. Der M. multifidus und die M. intertransversarii lumborum wurden an ihrem Ansatz am Processus transversus an den Lendenwirbeln 2 und 3 mit einer Metzenbaumschere durchtrennt. Mit einem Periostschaber wurden M.

multifidus/M. intertransversarii lumborum und Processus transversus cranial am Lendenwirbel 3 und caudal am Lendenwirbel 2 bis zum Wirbelkörper voneinander separiert.(Abb.14)

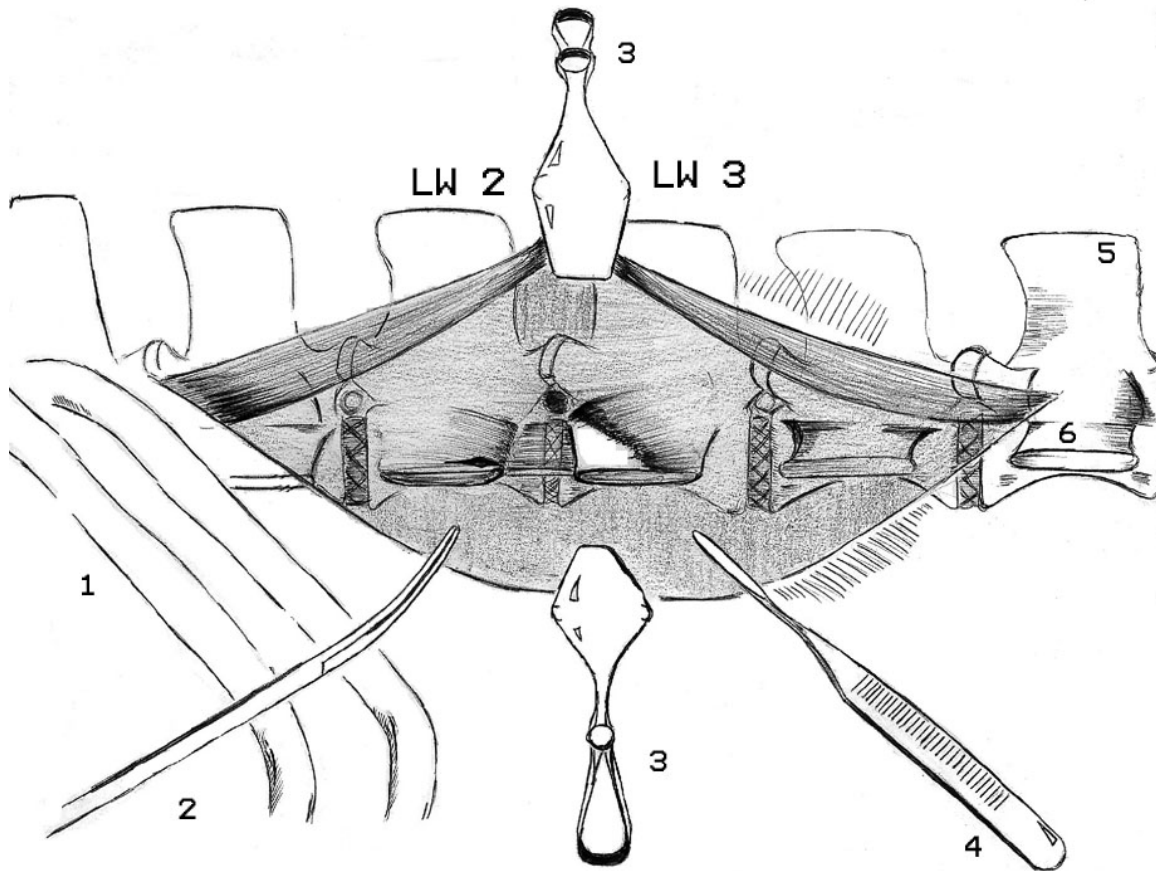


Abb. 14

1 = Rippe 2 = Metzenbaumschere 3 = Langenbeckhaken
 4 = Periostschaber 5 = Processus spinosus 6 = Processus transversus
 LW = Lendenwirbel

Mit einem Langenbeckhaken wurde der M. multifidus nach dorsal gezogen. 2mm cranial und 1-2mm ventral des cranialen Randes des Processus transversus am Wirbelkörper von L3 wurde durch vorsichtiges horizontales Spreizen der M. intertransversarii lumborum mit einer Peanklemme oder alternativ einer gebogenen Darmklemme nach Doyen der weisslich faserig strukturierte Anulus fibrosus freigelegt. Ein langgriffiges Skalpell mit 11er Klinge

wurde benutzt, um die Bandscheibe 2-3mm breit und 4-5mm lang zu fenestrieren. Fasern des Anulus fibrosus und Anteile des Nukleus pulposus werden mit einem Rongeur (2,0 mm) nach Caspar bis zu einer Tiefe von 8mm entfernt. (Abb. 15)

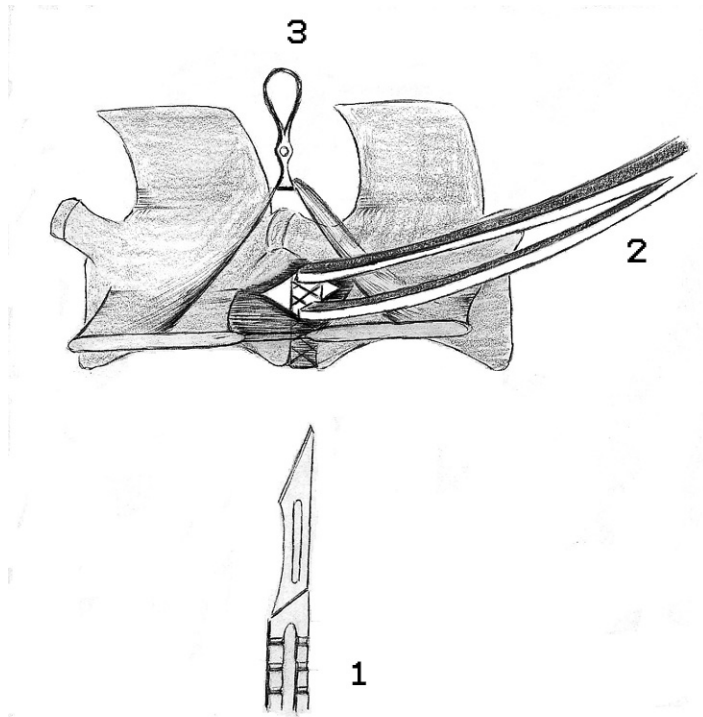


Abb. 15

1 = Skalpell 2 = Darmklemme nach Doyen 3 = Langenbeckhaken (verkleinert)

Das Biomaterial ASD (Endospine Ltd, Cham, Schweiz) wurde vom Hersteller unter sterilen Bedingungen aus zwei Komponenten vorbereitet. Nach Applikation einer Menge von 150 µl wurde mit einer Spiralbürste (Paro Isola Metallhalter Best.-Nr. 1021 + Spiralbürste Best.-Nr.1014, Esro AG., Thalwill, Schweiz) das Biomaterial zwischen den Fasern des Anulus fibrosus verteilt. Eine erneute Applikation von 150 µl erfolgte und nachdem das Material eine visköse Konsistenz angenommen hat wurde die Oberfläche versiegelt, um ein Auslaufen des Materials in die Muskulatur zu verhindern. Die Polymerisation war nach durchschnittlich 3 Minuten abgeschlossen. Die Fascie wurde mit einer Kürschnernaht unter Verwendung eines 2/0 Vicryl Fadens (Ethikon) vernäht. Die Unterhaut wurde fortlaufend mit horizontalen Rückstichen (2/0 Vicryl) vernäht.

Die Haut wurde geklammert (Auto Suture AG, Schweiz). Die Wundabdeckung geschah mit einem Tupfer, welcher mit Klammern (Auto Suture AG, Schweiz) befestigt wurde.

Noch unter Allgemeinanästhesie wurde bei latero-lateralen Strahlengang (80KV, 25mA, 1,0 sec) auf einen DI-AT-Film (Fuji Photo Film (Europe) GmbH, Düsseldorf, Germany) die Lendenwirbelsäule in einer Übersichtsaufnahme geröntgt (X-ray Aparatus HF 200, FA. Gierth GMBH, Deutschland).

Die Tiere standen durchschnittlich 45 Minuten nach Applikation des Biomaterials auf. Eine Antibiotikagabe (Penicillin 30.000 i.E./kg i.v. & Gentamycin 6 mg/kg i.v.) wurde 2x täglich über 3 Tage beibehalten. Temperaturkontrolle und Analgetikumgabe (Carprofen 4 mg/kg s.c.) erfolgte 1x täglich über 3 Tage post operationem. Auf neurologische Ausfallserscheinungen wurde geachtet und das Tier gegebenenfalls entsprechend dem Untersuchungsprotokoll im Anhang 2 untersucht. Die Wundabdeckung wurde nach 5 Tagen entfernt. Die Klammern wurden nach 10 Tagen gezogen.

Die Schlachtung erfolgte nach 3, 5, 6, 7 und 9 Monaten mit makroskopischer Beurteilung

Die Lendenwirbelsäule wurde aus dem Kadaver entnommen durch Disartikulation vom thoracolumbalen Übergang und lumbosacralen Übergang. Bei 3 Wirbelsäulen wurden Mikroradiographien (Faxitron x – ray System, Hewlett & Packard xx) auf einen DI-AT Film (Fuji Photo Film (Europe) GmbH, Düsseldorf, Germany) durchgeführt. Die anliegende Muskulatur wurde entfernt, wobei aus dem, der Anulotomie anliegenden, M. psoas major eine Probe entnommen wurde. Der Anulus fibrosus wurde makroskopisch evaluiert. Fibrotische Zubildungen wurden in die Grade 0-4 eingeteilt (0= keine Fibrose, 1= geringgradig, 2= mittelgradig, 3= hochgradig, 4= maximal). Kraterförmige Einziehungen der Fibrose wurden als 0=nicht vorhanden, 0,5= schwach ausgeprägt und 1= ausgeprägt beurteilt. Nach Abtrennen der Processi spinosi und der Processi transversi wurde der Diskus intervertebralis mit Teilen der

anschliessenden Wirbelkörper als ein ca. 1,5 cm breiter Block aus der Lendenwirbelsäule herausgesägt (Exakt® Bandsystem 310, Exakt Apparatebau GMBH, Norderstedt, Deutschland). Das Rückenmark wurde aus dem Sägeblock entfernt und nach Einlage in flüssigen Stickstoff bei –80 ° Celsius gelagert. Der Wirbelkanal wurde auf Rötung untersucht und dabei eingeteilt in 0= keine Rötung, 0,5= schwach ausgeprägte Rötung und 1= Rötung.

Probenaufbereitung

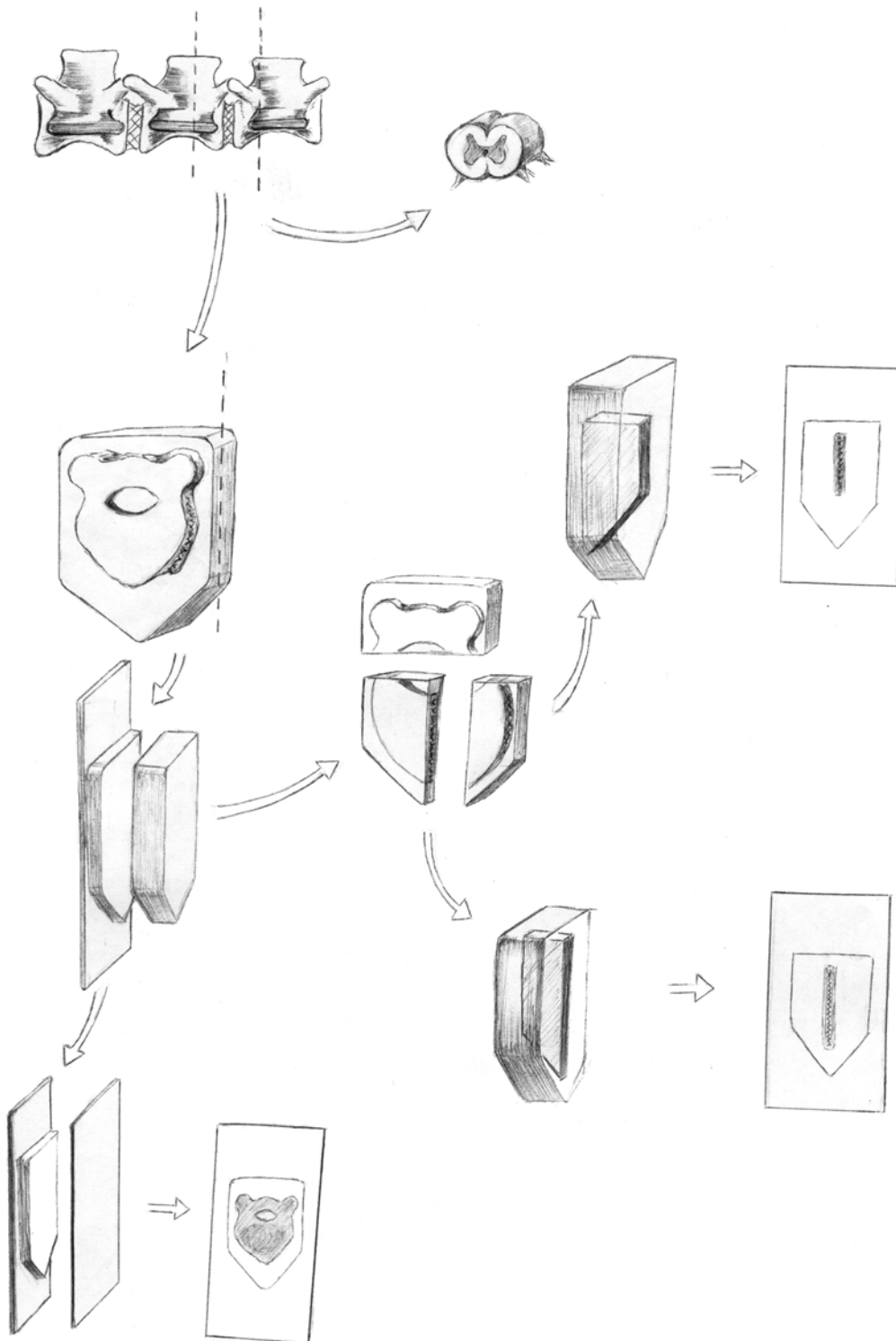
Die **Muskelprobe** wurde in Formalin 4% über 2 Tage fixiert und mit der Entwässerungsmaschine (Miles Scientific, Digitana AG, Horgen, Schweiz) weiter bearbeitet. Nach Einbettung in Parafin wurde die Probe als 3µm schnitt (Mikrotom HM 335 E, medite, Burgdorf, Deutschland) mit Hämatoxin-Eosin gefärbt (Tissue Stainer COT 20, medite, Burgdorf, Deutschland).

Das **Bandscheibenpräparat** wurde in Formalin 4% über 4 Tage fixiert, mit deionisierten Wasser gespült und in eine aufsteigende Alkoholreihe eingelegt. Anschliessend wurde das Präparat in Xylol evakuiert und in Polymethylmethacrylat (PMMA) (Leica® HistoDur, Leica Instruments GmbH, Deutschland) eingebettet. (siehe Präparationsprotokoll im Anhang 3)

Der PMMA-block wurde in 2 Ebenen geschnitten, ein transverser Schnitt, parallel zur Endplatte und ein mittig sagitaler Schnitt (Abb. 16)

Schleifschnitte (100 µm) von der transversen Ebene wurden unter Verwendung einer Bandsäge (Exakt® Bandsystem 310 mit Präzisionsparallelführung 310 CP, Exakt Apparatebau Norderstedt, Deutschland) und dem Präzisions-Schleifsystem Exakt 420 CL (Exakt Apparatebau GMBH, Norderstedt; Deutschland) angefertigt.

Abb.16



Dickschnitte (200 µm) von der sagitalen Ebene wurden unter Verwendung der Innenlochsäge (Leica® SP1600, Leica Instruments GmbH, Deutschland) angefertigt. Dünnschnitte (5 µm) von der sagitalen Ebene wurden angefertigt unter Verwendung eines Schnittmikrotom (Leica® Typ 2500, Leica Instruments GmbH, Deutschland). Schleifschnitte und Dickschnitte wurden mit Toluidin Blau gefärbt. Dünnschnitte wurden mit Toluidin Blau, van Kossa/ Mc Neal und Mason-Goldner gefärbt.

Von dem **Rückenmarkssegment** wurden 6 µm Kryoschnitte (Frigocut 2800, Reichert-Jung, Leica, Glattbrugg, Schweiz) angefertigt.

Die Immunhistochemische Aufbereitung des Rückenmarksegmentes erfolgte nach der indirekten Peroxidasemethode (EnVision™ DAKO). Eine Spülung mit gepufferten Peptonwasser (PBS) wurde nach jedem Teilschritt durchgeführt. Antikörperfärbungen mit Kaninchen Anti-human Antikörpern erfolgten für den Nachweis von Prostaglandin E₂ (PGE₂), induzierbare Stickoxid Synthetase (iNOS), Tumor Nekrosis Faktor α (TNF-α) und von Willebrandt Faktor (Faktor VIII). Der Kryoschnitt wurde in Aceton fixiert und die endogene Peroxidase durch in Wasser gelöstes 3 % H₂O₂ blockiert. Proteinblockade erfolgt mit dem Blocking Kit Dako™ Protein-Block-Serum-Free (DAKO Diagnostik, Zug, Schweiz). Nach Zugabe der primären Antikörper erfolgte eine Inkubation bei 37 ° C für eine Stunde in der Feuchtkammer. (Primäre AK und Verdünnung siehe unten stehende Tabelle)

Antikörper gegen :	Hersteller	Verdünnung	Antikörpertyp
PGE ₂	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland	1 : 100	polyklonal
iNOS	Upstate biotechnologie, NY, USA	1 : 100	polyklonal
TNF α	Milan Analytica GmbH	1 : 200 1 : 1000	monoklonal
Faktor 8	DAKO Diagnostik, Zug, Schweiz	1 : 100	polyklonal

Als Negativkontrolle diente PBS. Anti Kaninchen/ Anti Maus Antikörper gekoppelt mit Meerrettich Peroxydase (DAKO Chemomate TM En Vision TM / HRP, DAKO Diagnostik, Zug, Schweiz) wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur der Probe hinzugefügt. Sichtbarmachen der Reaktion geschah durch die Zugabe des AEC (red) Substrate Kit (Zymed Laboratories, Incorp. San Francisco, USA) für 5 bis 25 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle der Reaktion.

Des weiteren wurde das **Rückenmarkssegment** mit einer quantitativen real-time PCR (TaqMan® System, 7700 Sequence Detector, Perkin Elmer Applied Biosystems; Rotkreuz, Schweiz) untersucht auf die m-RNA der Induzierbaren Stickoxid Synthtase (iNOS), Cyclooxygenase 2 (Cox-2), Interleukin-1(IL-1) und Interleukin-6 (IL-6). Als Kontrolle wurde das housekeeping-gen GlycerinAldehyd-3-Phosphat-DeHydrogenase (GAPDH) verwendet. Die RNA wurde nach den Anleitungen des RNA-easy-handbooks (Quiagen AG, Basel, Schweiz) aus der Probe extrahiert. Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte gemäss dem Protokoll im Anhang 4. Verwendete Primer sind ebenfalls im Anhang 5 aufgelistet.

Die Temperatur und Zeiteinstellung der PCR betrug: 2 Min./50° C, 10 Min./95° C, 45x 15 Sek./ 95° C, 1 Min/60° C.

Probenauswertung

Die Beurteilung der Muskelprobe erfolgte lichtmikroskopisch (Olympus BX 41, Olympus Optical CO., LTD, Schwerzenbach, Schweiz) bei 10x40-facher Vergrösserung. Die Parameter Fibrose, Fibrozyten, Fibroblasten, Makrozyten, Granulozyten und Lymphozyten wurden in Grade eingeteilt und beurteilt.

Einteilung :

Grad 0 = kein Vorkommen

Grad 1 = geringgradiges Vorkommen

Grad 2 = mittelgradiges Vorkommen

Grad 3 = hochgradiges Vorkommen

Die Muskulatur wurde auf ASD–Vorkommen untersucht und das umliegende Gewebe beschreiben.

Anzeichen einer Muskeldegeneration wurden folgendermassen klassifiziert:

Lage der Muskelkerne.

0 = randsständig 1 = zentral in Teilgebieten 2= zentral grossflächig

Aufhellung der Muskulatur:

0= keine 1 = Aufhellung in Teilgebieten 2= grossflächige Aufhellung

Verlust der Querstreifung (QS):

0 = QS vorhanden 1 = teilweiser Verlust 2= grossflächiger Verlust

Die Summe der Muskeldegeneration wurde bewertet als:

keine Degeneration (0-1), milde Degeneration (2-3), ausgeprägte Degeneration (4-6)

Das Bandscheibenpräperat wurde bei 10x40-facher Vergrösserung mit dem Mikroskop Leica DMR (Leica Microsystems AG, Glattbrugg, Schweiz) ausgewertet. Anzeichen einer Degeneration wurden nach dem modifizierten Schema von Griess et al.³⁹ beurteilt. Des weiteren wurde die Integrietät des ASD und die Reaktion des umliegenden Gewebes beschrieb

Einteilung der histologischen Veränderungen in den lumbaren Bandscheiben

(modifiziertes Schema von Griess et al.) :

Grad	<u>Anulus Fibrosus</u>	<u>Nukleus Pulposus</u>	<u>Knorpelige Endplatte</u>
1	<ul style="list-style-type: none"> -Intakte Lamellen -dünne interlamelläre Matrix -intakte Anulusinsertion -Gefässe nur im äusseren $\frac{1}{3}$ 	<ul style="list-style-type: none"> -Homogenität -keine Risse 	<ul style="list-style-type: none"> -gleichförmige Dicke -Intakte Verbindung z. Knochen -gleichmässige Kalzifikation -gleichmässige Zellverteilung
2	<ul style="list-style-type: none"> -geringfügige Zerstörung und Auflösung der Lamellen -Auflockerung der Matrix -wenig Auflösung der Anulusinsertion -periphere Risse ohne Reparaturreaktion 	<ul style="list-style-type: none"> -kleine Risse -wenig Zellnekrose -geringfügige Anulusverlagerung nach dorsal -wenig Chondronbildung 	<ul style="list-style-type: none"> -kleine Querfissuren -unregelmäss. Verdickung der Kalzifikationszone -wenig Gefässkanäle -kleine Chondrone
3	<ul style="list-style-type: none"> -mässige Lamellendisorganisation -mittlere Matrixauflockerung -teilweise zerstörte Anulusinsertion -radiäre Risse, nicht das äusseren $\frac{1}{3}$ involvierend -minimale knorpelige Metaplasie -zystische Degeneration -Gefässe im äusseren und mittleren $\frac{1}{3}$ -periphere Risse mit geringer Reparaturreaktion 	<ul style="list-style-type: none"> -mässige Rissbildung -mässige Zellnekrose -zystische Degeneration -mässige Dorsalverlagerung innerhalb des AF -zentripetale Ausbreitung des Kollagens mässige Chondronbildg. 	<ul style="list-style-type: none"> -deutliche Verdickung der Kalzifikationszone -viele Querfissuren -viele Gefässkanäle -viele Chondrone
4	<ul style="list-style-type: none"> -ausgedehnte Lamellendisorganisation -radiäre Risse bis ins äussere $\frac{1}{3}$ -ausgeprägte Knorpelmeta plasie -Gefässe in allen Zonen -periphere Risse mit deutlicher Reparaturreaktion 	<ul style="list-style-type: none"> -kompletter Verlust des NP -lose Anordnung / frangmentierter NP -deutliche Chondronbildung 	<ul style="list-style-type: none"> -Massive Unregelmässigkeiten der Kalzifikationszone -grossflächige Risse

Der Abstand des Zwischenwirbelraums wurde bei 1,25x16-facher Vergrößerung (Leica M 420) im mittig sagitalen Schnitt an der dorsal engsten Stelle mit Leica Qwin (Leica Microsystems AG, Glattbrugg, Schweiz) gemessen.

Die immunhistochemische Färbungen des Rückenmarks wurden mikroskopisch beurteilt bei 10 x40 facher Vergrößerung (Olympus BX 41, Olympus Optical CO., LTD, Schwerzenbach, Schweiz). Es erfolgte eine Einteilung in die Grade 0-2 (0= keine Reaktion, 1= vereinzelt positive Reaktion, 2= ausgeprägt positive Reaktion)

Real-time PCR

Als housekeeping- gen wurde GAPDH verwendet. Der korrigierte CT-Wert (Δ CT) wurde nach unten stehender Formel errechnet.

$$\text{CT-Wert Entzündungsmediator} - \text{CT-Wert GAPDH} = \Delta \text{CT}_{\text{Entzündungsmediator}}$$

Als Vergleichswert wurde der Δ CT-Werte des Rückenmarks eines nicht operierten Tieres definiert. Der $\Delta\Delta$ CT-Wert errechnet sich nachfolgender Formel:

$$\text{Vergleichswert} - \Delta \text{CT}_{\text{Entzündungsmediator}} = \Delta\Delta \text{CT}$$

Es erfolgte eine Umrechnung, um den logarithmischen $\Delta\Delta$ CT-Wert linear darzustellen.

Umrechnung : $2^{(\Delta\Delta \text{CT})}$; falls $\Delta\Delta \text{CT}$ negativ : $-2^{(-\Delta\Delta \text{CT})}$

Die Ergebnisse dieser Studie wurden mit Excel (Microsoft®) ausgewertet bzw. als Grafiken dargestellt.

Resultate

Anzahl der Tiere

Ein Tier wurde aufgrund von neurologischen Ausfallserscheinungen einen Tag postoperativ euthanasiert. Von den restlichen Tieren wurden 3 Wirbelsäulen ohne weitere Auswertung bei -20° C tiefgefroren und für biomechanische Testungen bereitgehalten, so dass die eine zur Auswertung verfügbare Anzahl (n) von 21 verbleibt. (siehe Tabelle 1)

Tabelle 1 Anzahl der Tiere und postoperative Periode:

Gruppe	3 Monate	5 Monate	6 Monate	7 Monate
ASD (Implantation)	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere
Kontrolle (sham)	3 Tiere		3 Tiere	3 Tiere

Die **Operation** verlief planmässig bei 24 Tieren. Blutungen in die fenestrierte Bandscheibe traten nicht auf.

Bei einem Tier penetrierte der Rongeur intraoperativ den Wirbelkanal. Dieses Tier zeigte postoperativ eine Hinterhandparalyse und wurde einen Tag postoperativ euthanasiert.

Postoperative Wundschwellung mit subkutaner Flüssigkeitsansammlung (Serom) trat bei 2 Tieren auf. Beim einen Tier ging die Schwellung innerhalb von 10-14 Tagen zurück, während beim anderen Tier drainiert wurde. Das Serom lag bei beiden oberflächlich zwischen der Haut und der Faszie und hatte auf das implantierte ASD material keinen Einfluss.

Keines der restlichen 24 Tiere zeigte in der postoperativen Periode neurologische Ausfallserscheinungen.

Postoperative Röntgenbilder zeigten bei allen Schafen eine leichte Verschattung im Foramen intervertebrale der LW 2-3, welche sich in Form eines Umrissverlustes des „Pferdekopfes“ darstellte. Das Biomaterial war radiographisch nicht darstellbar. (Bildanhang 1)

Nach der Schlachtung der Tiere wurde die Lendenwirbelsäule aus dem Schlachtkörper entnommen und die anliegende Muskulatur vorsichtig entfernt. Die Anulotomiestelle wurde identifiziert und makroskopisch beurteilt.

Anschliessende Mikroradiographien erfolgten bei 3 Tieren. Das entsprechende Bandscheibensegment wurde aus der Wirbelsäule herausgesägt und weiter bearbeitet für eine mikroskopische Beurteilung.

Die makroskopische Beurteilung

Die Anulotomiestelle wurde bei allen Tieren eindeutig identifiziert. In der Implantationsgruppe war das Biomaterial in allen Fällen ersichtlich.

Fibrotisches Gewebe an der Anulotomiestelle lag in allen Fällen vor, war jedoch oftmals schwach ausgeprägt.

In der Kontrollgruppe ergab sich eine hochgradige **Fibrose** an der Anulotomiestelle 3 und 7 Monate post operativ, während bei den 6 Monate Schafen dieser Gruppe nur eine gering- bis mittelgradige Fibrose gefunden wurde. Die Implantationsgruppe zeigte nach 3 bis 6 Monaten allenfalls eine geringgradige Fibrose. Hingegen stellte sich nach 7 Monaten eine hochgradige Fibrose dar (siehe Abb.17)

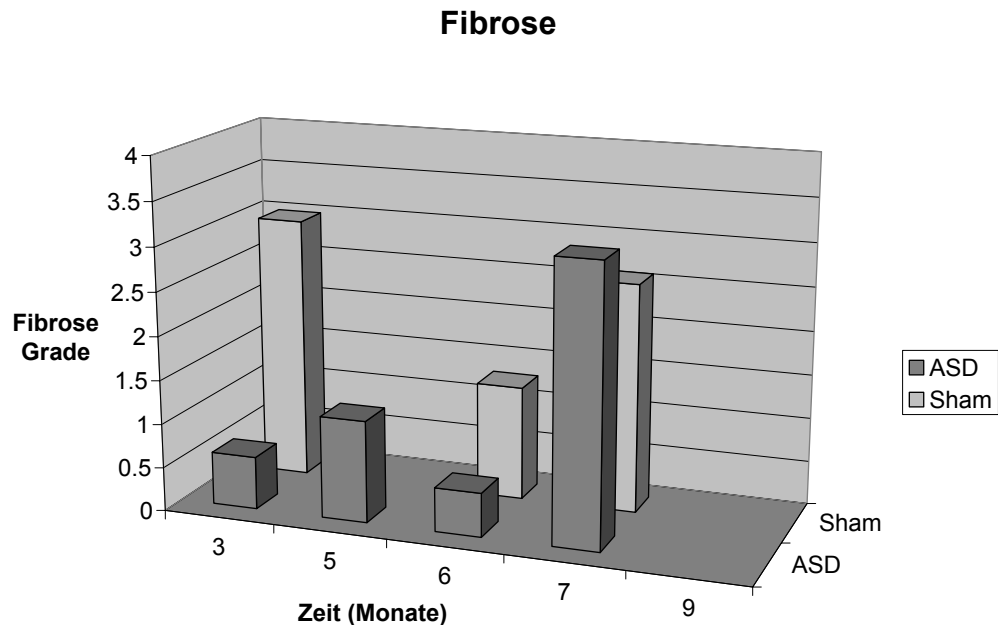


Abb. 17

Legende : Fibrosegrade 0= keine Fibrose, 1= geringgradige Fibrose, 2= mittelgradige Fibrose, 3= hochgradige Fibrose, 4= höchstgradige Fibrose

Dargestellt in dieser Grafik sowie auch in folgenden Grafiken soweit nicht anders angegeben ist der arithmetische Mittelwert einer Gruppe von 3 Tieren (n = 3) pro Balken.

Eine **kraterförmige Einziehung der Fibrose** war nur in der Kontrollgruppe sichtbar. Sie stellte sich 3 Monate post operativ ausgeprägt dar und war nach 7 Monaten nicht mehr ersichtlich. (siehe Abb. 18 und Bildanhang 2)

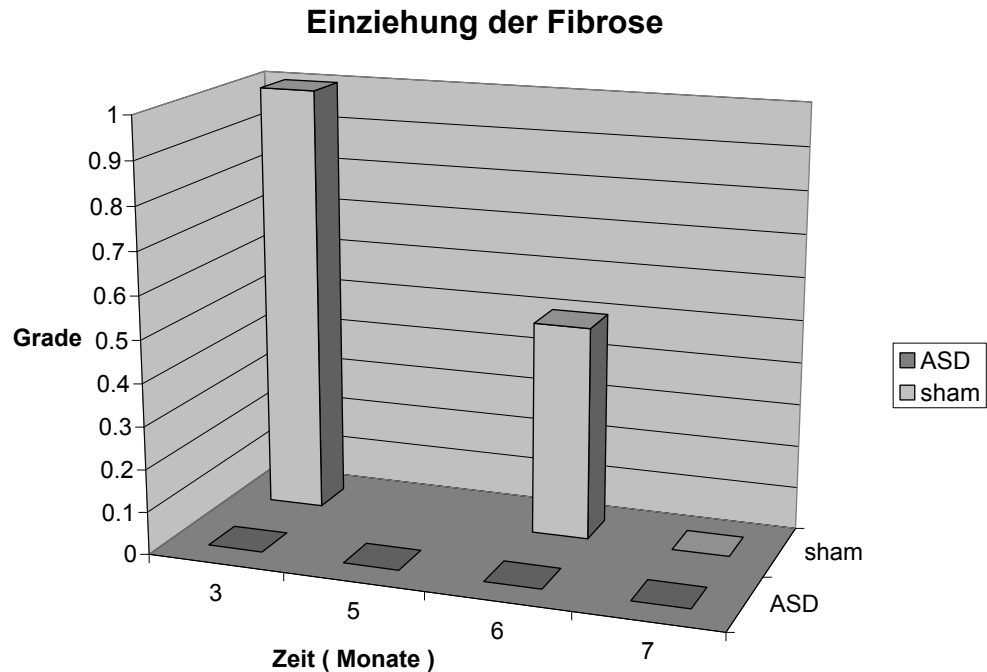


Abb. 18

Legende : Grad 0= keine Einziehung der Fibrose, 0.5= geringgradige Einziehung, 1= ausgeprägte Einziehung

Eine **rötliche Verfärbung des Wirbelkanals** nach Entfernen des Rückenmarks stellte sich nur in der Kontrollgruppe nach 3 Monaten deutlich dar. Eine schwach ausgeprägte Rötung war nach 6 und 7 Monaten sichtbar. In der Implantationsgruppe war keine Rötung sichtbar nach 3 Monaten und nur eine schwach ausgeprägte Rötung nach 5, 6 und 7 Monaten. (siehe Abb. 19)

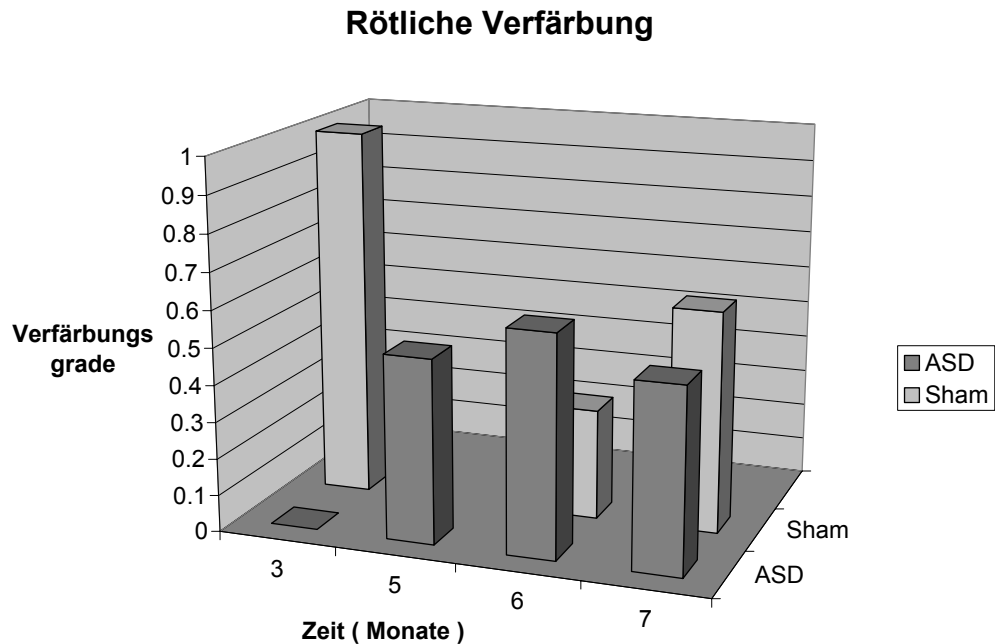


Abb. 19

Legende : 0= keine rötliche Verfärbung, 0.5= schwach ausgeprägte rötliche Verfärbung, 1= deutlich rötliche Verfärbung

Die **Mikroradiographien** zeigten das Biomaterial ausserhalb des Zwischenwirbelraums liegend in allen 3 Fällen.(Bildanhang 3)

Die histologische Beurteilung

Die H/E Färbung der **Muskulatur** zeigte allenfalls geringgradig fibrotisches Gewebe in der Kontrollgruppe. Fibrotisches Gewebe wurde anhand von spindelförmigen Fibroblasten und einer ungeordneten interzellulären Matrix identifiziert. Mässig ausgeprägt lag fibrotisches Gewebe 3 Monate postoperativ in der Implantationsgruppe vor. 5 und 6 Monate postoperativ zeigte sich eine allenfalls geriggradige Fibrose, sowie eine geringgrade Fibrose nach 7 Monaten. (siehe Abb. 20)

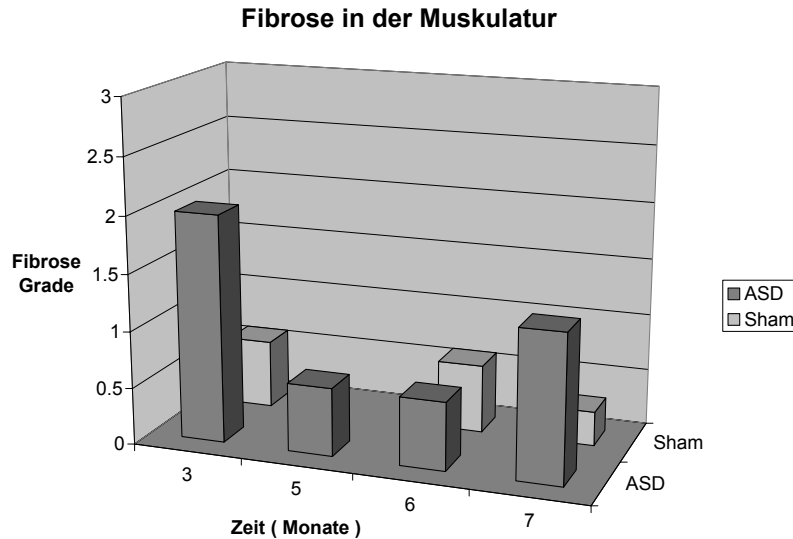


Abb. 20

Legende: 0=keine Fibrose, 1=geringgradige Fibrose, 2= mittelgradige Fibrose, 3= hochgradige Fibrose

Reste von ASD-material waren in der Muskulatur in 7 von 12 Proben (58,3 %) nachweisbar. Morphologisch wurden Fibroblasten, Fibrozyten und Makrophagen nach der unten stehenden Tabelle identifiziert.

Zelltyp	Morphologie
Fibroblasten	Rund, spindelförmig mit aktivierten hyperthrophen Kern, umgeben von Bindegewebe
Fibrozyten	Schmal, spindelförmig
Makrophagen	Runder, zentral oder ekkzentrisch liegender Kern; schaumiges Zytoplasma, ggf. Ablagerung von gelbbraunen Pigment (Hämosiderin)

Diese Zelltypen wurden in unterschiedlicher zeitabhängiger Gewichtung vermehrt in der ASD-Gruppe nachgewiesen. (siehe Bildanhang 4)

Fibroblasten wurden in gering- bis mittelgradiger Anzahl 3 Monate postoperativ in der Implantationsgruppe nachgewiesen. (siehe Abb. 21)

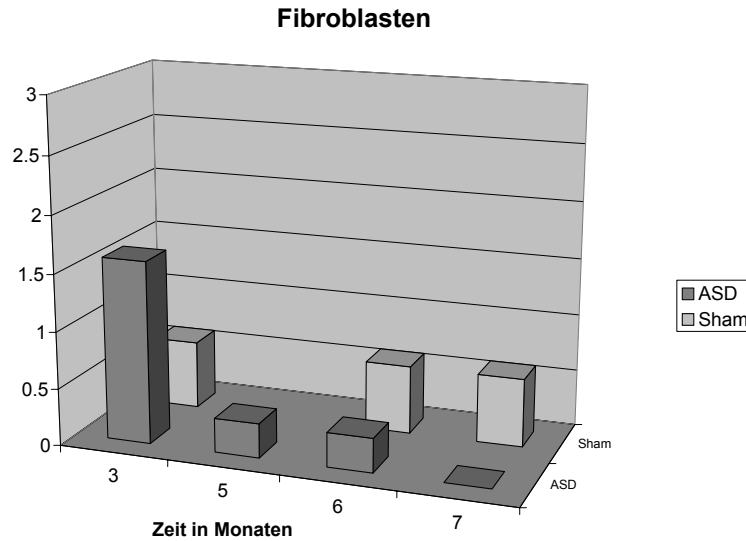


Abb. 21

Legende: 0= kein Vorkommen, 1= geringgradiges Vorkommen, 2= mittelgradiges Vorkommen, 3= hochgradiges Vorkommen

Fibrozyten lagen mittelgradig in der Implatationsgruppe 6 Monate postoperativ vor. Restliche Werte waren allenfalls geringgradig. (siehe Abb. 22)

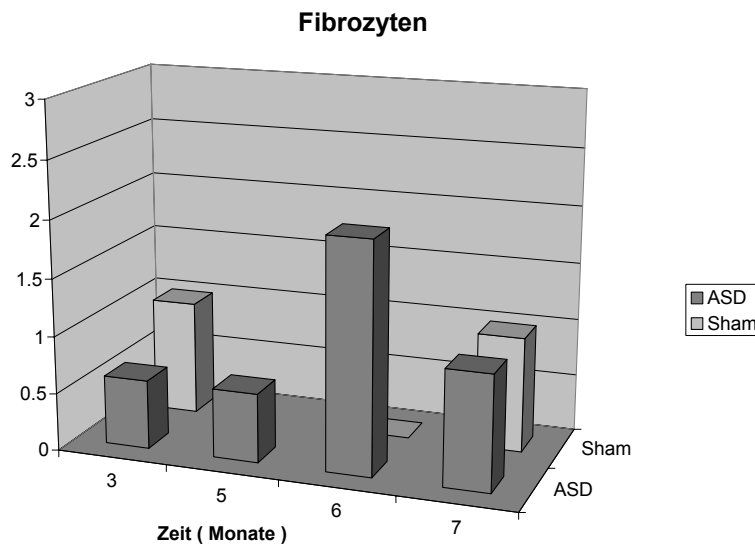


Abb. 22

Legende: 0= kein Vorkommen, 1= geringgradiges Vorkommen, 2= mittelgradiges Vorkommen, 3= hochgradiges Vorkommen

Makrophagen lagen hochgradig in der Implantationsgruppe 3 Monate postoperativ vor. Eine Abnahme der Makrophagenzahlen erfolgte in der Implantationsgruppe in Abhängigkeit zur Zeit. Die Kontrollgruppe zeigte einen konstant niedrigen Wert (kein bis geringgradig) (siehe Abb.23)

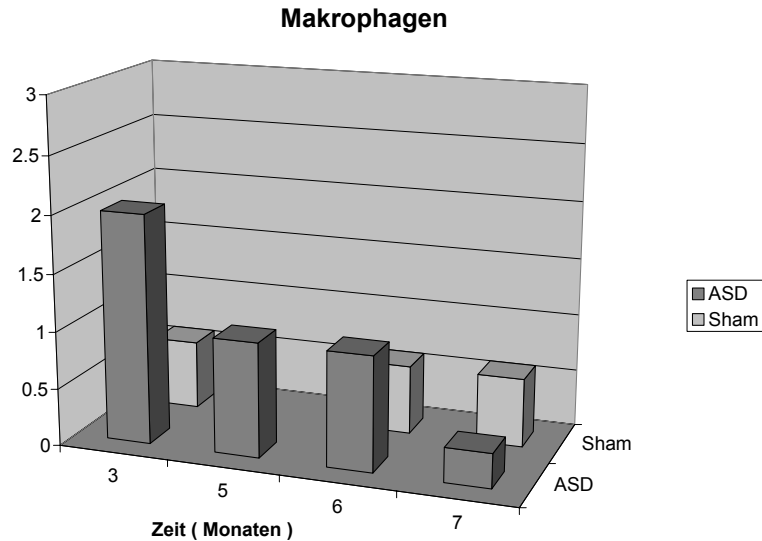


Abb.23

Legende: 0= kein Vorkommen, 1= geringgradiges Vorkommen, 2= mittelgradiges Vorkommen, 3= hochgradiges Vorkommen

Granulozyten oder Lymphozyten konnten nicht nachgewiesen werden.

Eine ausgeprägte **Muskeldegeneration** lag nur in der Implantationsgruppe 6 Monate post operativ vor. Eine Muskeldegeneration wurde mikroskopisch aufgrund einer zentralen Lage der Muskelkerne, Aufhellung der Muskulatur und Verlust der Querstreifung identifiziert. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der ASD-Gruppe zeigte sich mit Ausnahme des Ergebnisses der Implantationsgruppe bei 6 Monaten eine rückläufige Tendenz. (siehe Abb.24)

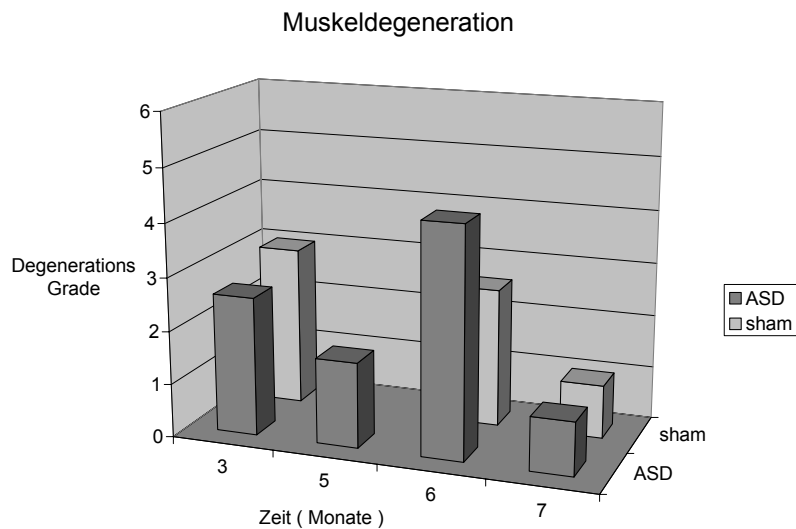


Abb.24

Legende: 0-1= keine Degeneration, 2-3= milde Degeneration, 4-6= ausgeprägte Degeneration

Die **immunhistochemischen Färbungen** für Faktor VIII, iNOS, TNF α sowie PGE₂ ergaben keine Unterschiede zwischen der Implantations- und der Kontrollgruppe. Vereinzelt positive Reaktionen (Grad 1) lagen bei Faktor VIII, iNOS und TNF α vor. Reaktionen von Grad 1-2 lagen bei PGE₂ in beiden Gruppen vor.

Histologische Untersuchungsergebnisse des

Bandscheibenpräparates:

Das Bandscheibenpräparat wurde sowohl in nicht dekalzifizierten Dickschnitt als auch im Dünnschnitt untersucht.(siehe Bildanhang 5 und 6)

Das Biomaterial lag ausserhalb des Anulus fibrosus in 100% der Fälle.(siehe Bildanhang 7)

Das ASD lag dabei lateral der Fenestration, dem Wirbelkörper anliegend. Umgeben war das ASD von fibrotischen Gewebe mit Gefässeinsprossung. Morphologisch wurden Makrophagen in 100% der Fälle und Lymphozyten in 33% der Fälle identifiziert. Beide Zelltypen kamen vereinzelt oder in kleinen Gruppen dem ASD anliegend vor.

Ausgeprägte Entzündungsreaktionen lagen nicht vor.

Spuren von ASD innerhalb des AF lagen in 5 von 12 Fällen vor (41,6%). Der AF zeigte dabei in 4 Fällen massive Disorganisation mit Gefässeinsprossung. Diese Veränderungen wurden aufgrund der Lamellendisorganisation und der Gefässeinsprossung als Grad 3 nach dem mod. Schema nach Griess et al. klassifiziert. Im anderen Fall lag das ASD reaktionslos zwischen den Lamellen mit geringgradiger Matrix-Aufhellung. Diese Veränderungen wurden als Grad 1-2 klassifiziert.

Die einzelnen Veränderungen der Bandscheibe aus beiden Gruppen, geordnet nach ihrer Häufigkeit, sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

Veränderungen des AF:

Zentripedale Faserrichtung	52,38 %
Knorpelige Metaplasie	38,09 %
Periphere Risse	28,57 %
Lamellendysorganisation	28,57 %
Konzentrische Risse	23,80 %
Chondronbildung	19,05 %
Gefässeinsprossung bis ins mittlere 1/3	19,05 %
Radiäre Risse	14,28 %
Matrixaufhellung	14,28 %
Geweitete interlamelläre Matrix	14,28 %
Radiärer Riss bis ins äussere 1/3	4,76 %
Radiärer Riss mit Reparaturprozess	4,76 %

Veränderungen des NP :

Inhomogene Erscheinung	61,19 %
Verlagerung innerhalb des AF	52,38 %
Chondronbildung	47,62 %
Risse	47,62 %
Kompletter Verlust	19,05 %
Abgrenzung zwischen AF und NP erschwert	4,76 %
Kalzifizierung	4,76 %
Fragmentierter NP	4,76 %

Veränderungen der EP :

Chondronbildung	38,09 %
Unregelmässigkeit	33,3 %
Unterbrechung	9,52 %
Unregelmässige Zellverteilung	9,52 %
Querfissur	9,52 %
Kalzifizierte Hervorwölbung	9,52 %
Ablösung von EP und NP	4,76 %

Die Anzahl der Gefässkanäle der EP lag bei 4 –17 pro Seite, der Durchschnitt liegt bei 10,57.

Auswertung des modifizierten Schemas nach Gries et al. :

In der Kontrollgruppe lag eine geringgradige Degeneration der Bandscheibe bei einem Zeitpunkt von 3 Monaten vor.

Eine gering- bis mittelgradige Degeneration wurde nach 6 Monaten beobachtet und eine mittelgradige Degeneration lag nach 7 Monaten vor.

In der Implantationsgruppe lag eine gering- bis mittelgradige Degeneration 3 und 5 Monate postoperativ vor. Nach 6 Monaten zeigte sich keine bis eine geringgradige Degeneration. Eine gering bis mittelgradige Degeneration lag nach 7 Monaten vor. (siehe Abb. 25)

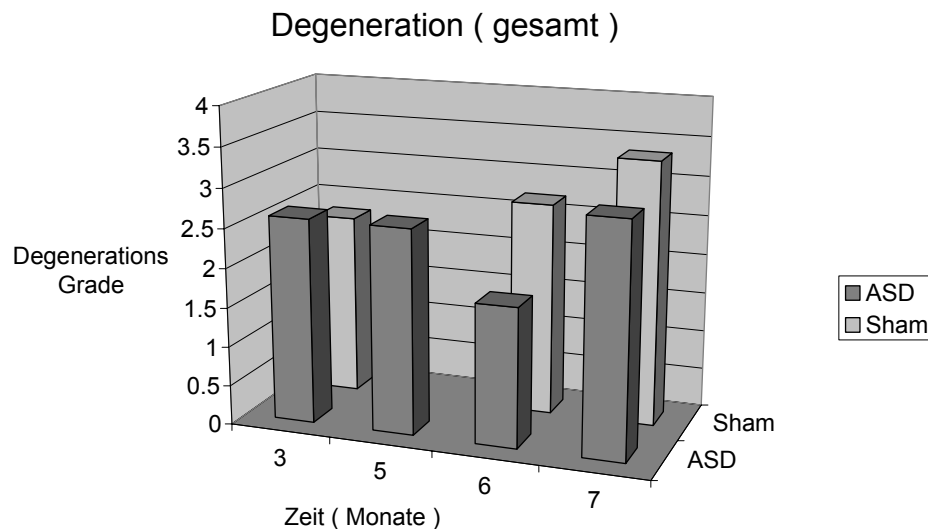


Abb.25

Legende: Degenerationsgrade nach dem modifizierten Schema von Griess et al.

1= keine Degeneration, 2= geringgradige Degeneration, 3= mittelgradige Degeneration, 4= hochgradige Degeneration

Bei einer Betrachtung der degenerativen Veränderungen der Einzelkomponenten der Bandscheibe (Anulus fibrosus (AF), Nukleus pulposus (NP), knorpelige Endplatte (EP)) zeigte der Nukleus pulposus Unterschiede zur Gesamtdegeneration. Der Nukleus pulposus war in der Kontrollgruppe stärker degenerativ verändert als in der Implantationsgruppe. Dieses stellte sich besonders deutlich als eine hochgradige Degeneration nach 7 Monaten dar.(siehe Abb.26)

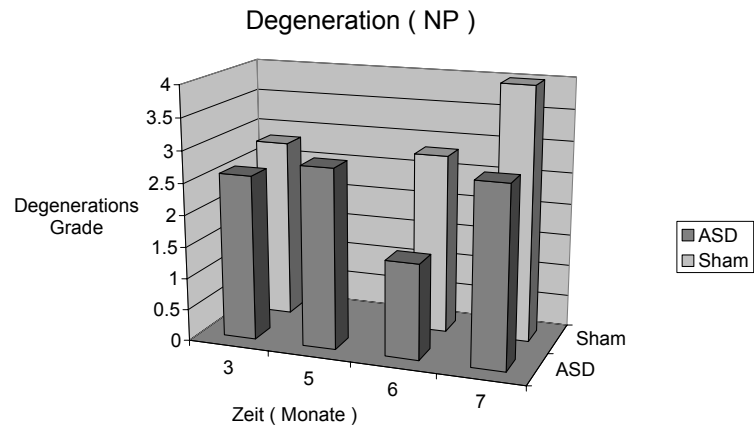


Abb.26

Legende: 1= keine Degeneration, 2= geringgradige Degeneration, 3= mittelgradige Degeneration, 4= hochgradige Degeneration

Degenerative Veränderungen des Anulus fibrosus und der Endplatte konnten nicht als deutliche Unterschiede gegenüber der Gesamtdegeneration gefunden werden. (siehe Abb. 27 und Abb. 28)

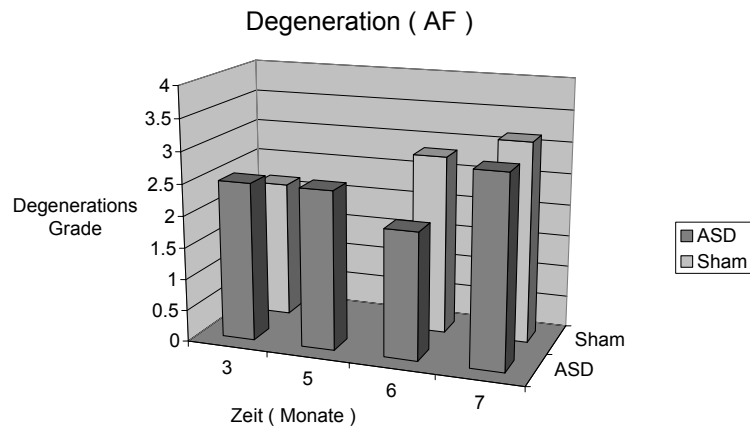


Abb. 27

Degeneration des Anulus fibrosus (AF) Legende: 1= keine Degeneration, 2= geringgradige Degeneration, 3= mittelgradige Degeneration, 4= hochgradige Degeneration

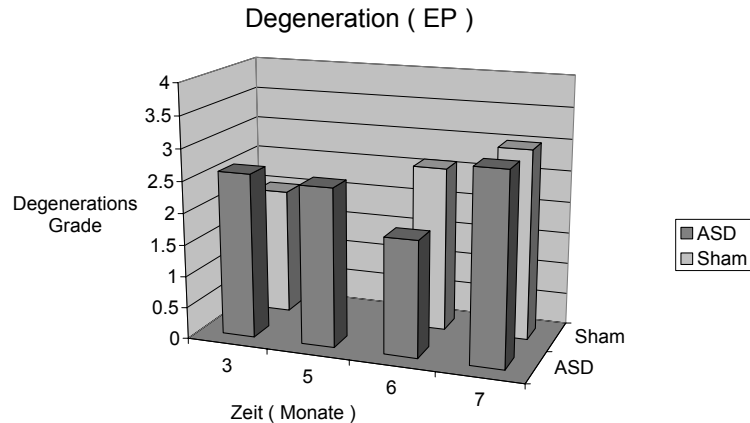


Abb. 28

Degeneration der Endplatte (EP) Legende: 1= keine Degeneration, 2= geringgradige Degeneration, 3= mittelgradige Degeneration, 4= hochgradige Degeneration

Ausmessung des Zwischenwirbelraums :

Der Abstand des Zwischenwirbelraums wurde im nicht dekalzifizierten Dünnschnitt an der dorsal engsten Stelle mittels Leica Qwin (Leica Microsystems AG, Glattbrugg, Schweiz) gemessen.

Der Abstand des Zwischenwirbelraums aller Tiere lag zwischen 601 bis 2049 μm . Der Durchschnittswert betrug 983,81 μm .

Eine Abhängigkeit zwischen dem Abstand des Zwischenwirbelraums und der postoperativen Periode, oder sigifikante Unterschiede zwischen der Implantationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte nicht beobachtet werden. Der weiteste Zwischenwirbelraum wurde sowohl in der Implantationsgruppe als auch in der Kontrollgruppe nach 6 Monaten beobachtet. (siehe Abb. 29)

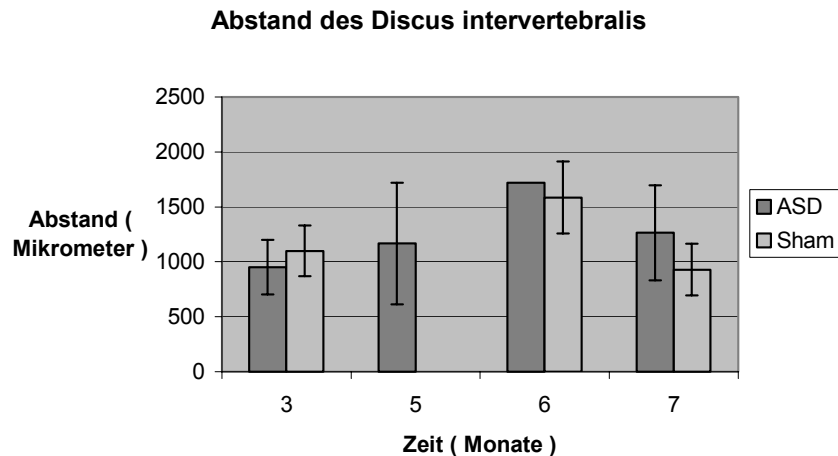


Abb. 29

Anzahl der ausgewerteten Proben (n)

	3 Monate	5 Monate	6 Monate	7 Monate
Sham	2		3	3
ASD	3	3	1	3

Auswertungen der Real time PCR:

Die CT-Werte, Δ CT-Werte und $\Delta\Delta$ CT-Werte sind im Anhang 6 angegeben.

In fast alle Proben der operierten Tiere konnte eine erhöhte Expression der Entzündungsmediatoren nachgewiesen. Lediglich Interleukin 1 in der Kontrollgruppe nach 6 Monaten zeigte niedrigere Werte als der Vergleich (Nullwert). Als Nullwert wurde das Rückenmarkssegment eines nicht operierten Tieres definiert. In der Implantationsgruppe lagen im Allgemeinen höhere Werte als in der Kontrollgruppe vor. Hohe interindividuelle Unterschiede resultieren in einer hohen Standardabweichung.

Interleukin 1 stellte sich in der Implantationsgruppe ausnahmslos stärker dar als in der Kontrollgruppe. Der Wert der Implantationsgruppe nach 6 Monaten hebt sich deutlich von den anderen Werten ab und zeichnete sich durch eine hohe Standardabweichung aus. (siehe Abb. 30)

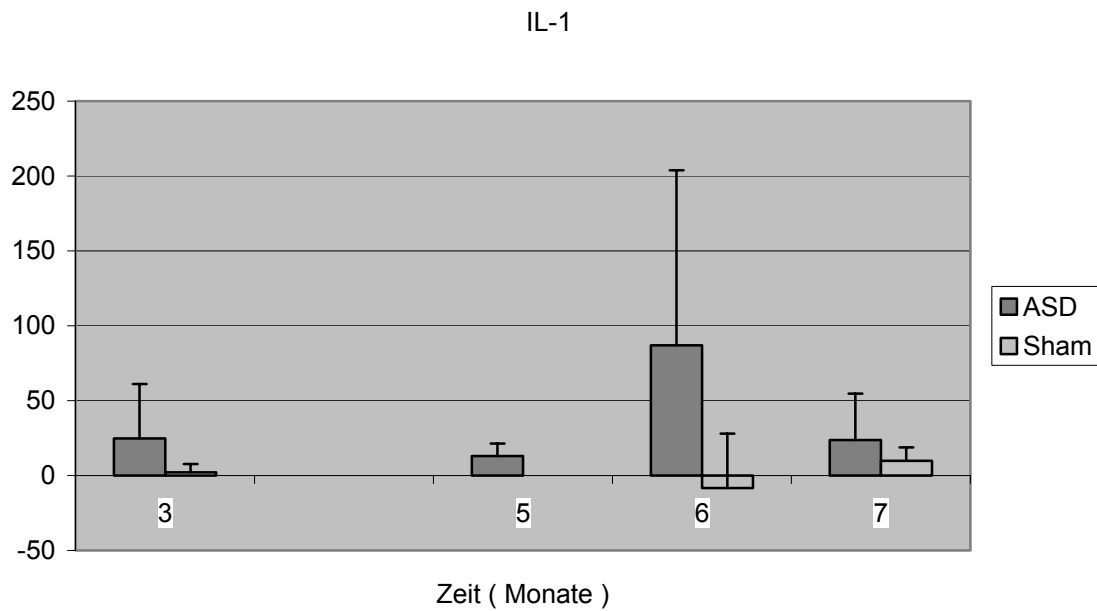


Abb.30

Dargestellt ist Erhöhung des Entzündungsmediators gegenüber der Probe eines nicht operierten Tieres (Nullwert)

Interleukin 6 zeigt im Gegensatz zu Interleukin 1 höhere Werte in der Kontrollgruppe nach 6 und 7 Monaten. Alle Werte sind höher als der Vergleichswert. Die Standardabweichung ist allgemein stark ausgeprägt. (siehe Abb. 31)

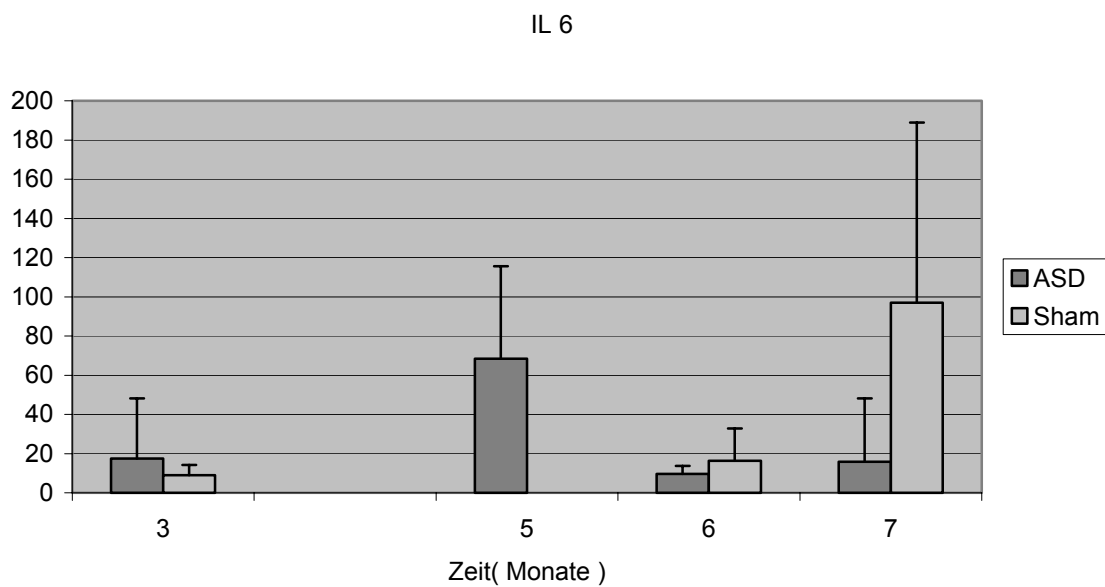


Abb. 31

Dargestellt ist Erhöhung des Entzündungsmediators gegenüber der Probe eines nicht operierten Tieres (Nullwert)

Die Cyclooxygenase 2 (COX 2) lag bis zu einem Zeitraum von 6 Monaten vermehrt in der Implantationsgruppe vor. Nach 7 Monaten konnten höhere Werte in der Kontrollgruppe gezeigt werden. Alle Werte lagen über dem Vergleichswert. Die Standardabweichung variiert zwischen den Gruppen erheblich. (siehe Abb. 32)

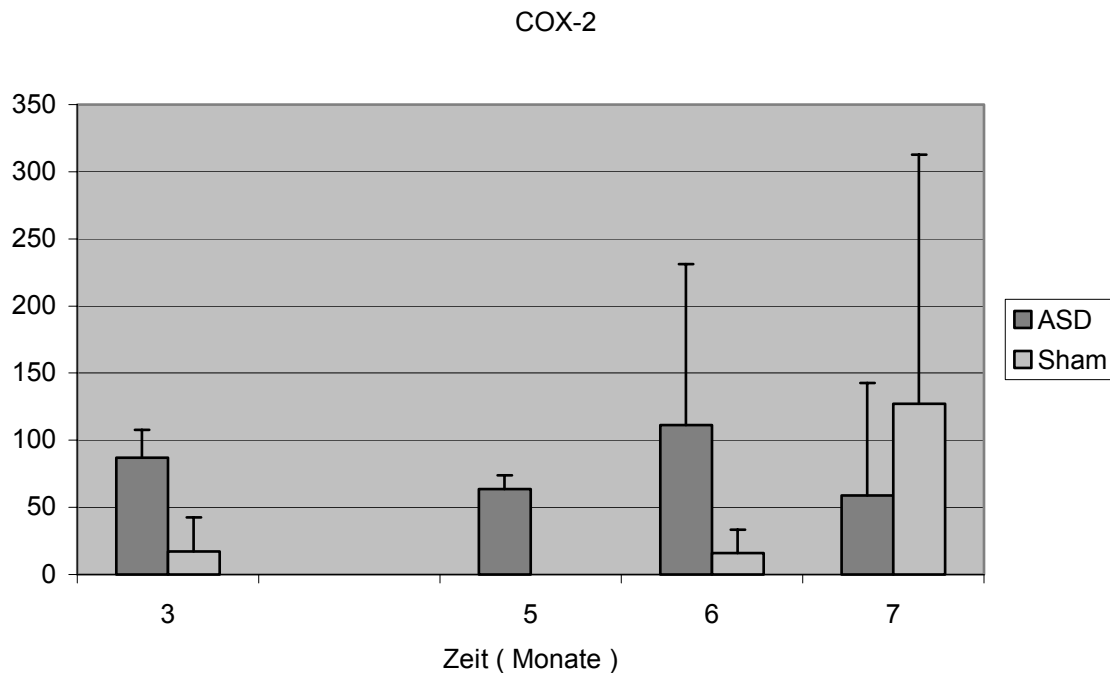


Abb. 32

Dargestellt ist Erhöhung des Entzündungsmediators gegenüber der Probe eines nicht operierten Tieres (Nullwert)

Die induzierbare Stickoxidsynthetase (iNOs) stellte sich nach einem Zeitraum von 3 Monaten ohne Unterschiede zwischen der Implantations- und der Kontrollgruppe dar. Nach 6 Monaten und deutlicher nach 7 Monaten konnten höhere Werte in der Implantationsgruppe nachgewiesen werden. Die Standardabweichung stellt sich besonders ausgeprägt in der Implantationsgruppe nach 7 Monaten dar. Alle Werte lagen über dem Vergleichswert. (siehe Abb. 33)

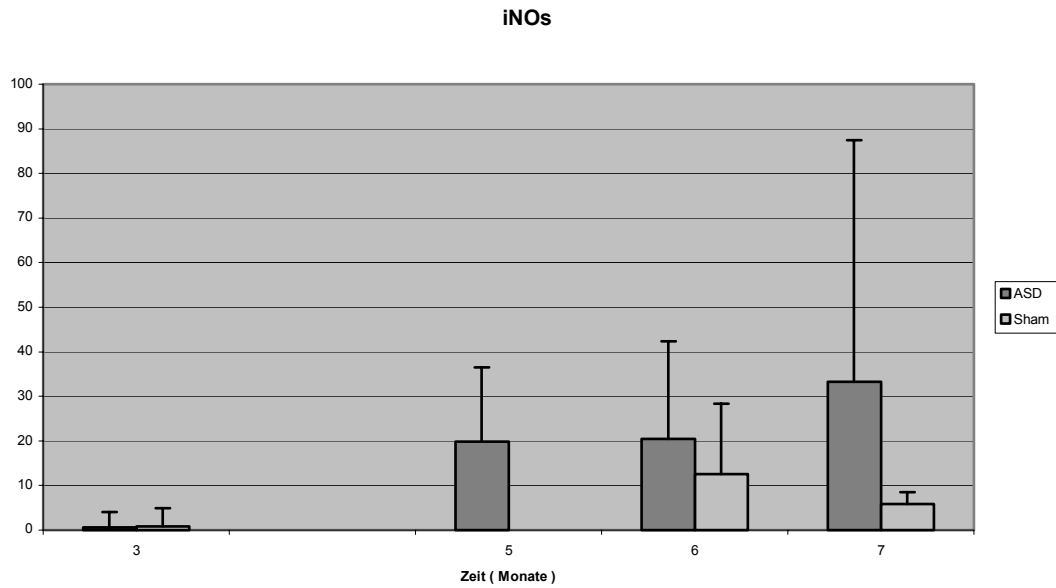


Abb. 33

Dargestellt ist Erhöhung des Entzündungsmediators gegenüber der Probe eines nicht operierten Tieres (Nullwert)

Relationen zum Alter oder zum Gewicht :

Eine signifikante Relation zwischen der Degeneration der Bandscheibe und dem Alter war nicht ersichtlich. Jedoch lag die Tendenz einer Zunahme der Degeneration mit dem Alter vor. (siehe Abb.34)

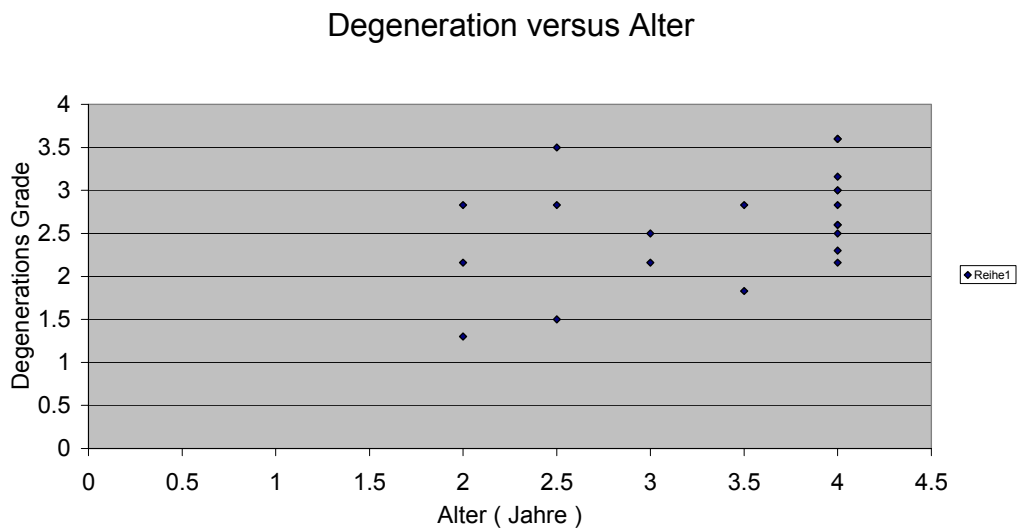


Abb. 34

Legende: 1= keine Degeneration, 2= geringgradige Degeneration, 3= mittelgradige Degeneration, 4= hochgradige Degeneration

Eine Korrelation zwischen dem Gewicht der Tiere und dem Degenerationsgrad der Bandscheibe war nicht ersichtlich. (siehe Abb. 35)

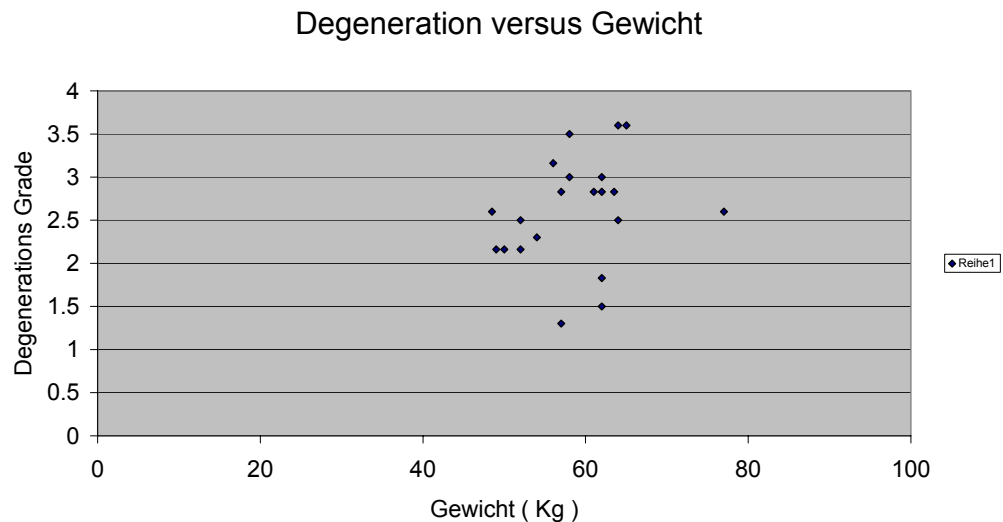


Abb. 35

Legende: 1= keine Degeneration, 2= geringgradige Degeneration, 3= mittelgradige Degeneration, 4= hochgradige Degeneration

Eine scheinbare Korrelation zwischen dem Abstand des Zwischenwirbelraums und dem Alter des Tieres stellte sich bis zu einem Alter von 3,5 Jahren dar. Es machte den Anschein, dass der Abstand des Zwischenwirbelraums mit dem Alter wider Erwarten zunahm. Die Gruppe der 4 jährigen Tiere zeigte jedoch wie breit die Varianz des Abstandes sein kann. (siehe Abb. 36)

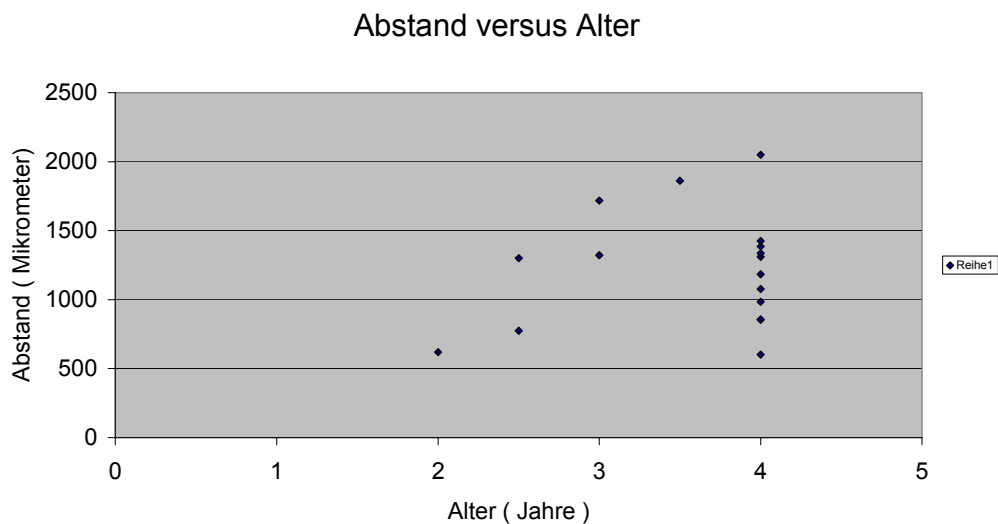


Abb. 36

Legende: 1= keine Degeneration, 2= geringgradige Degeneration, 3= mittelgradige Degeneration, 4= hochgradige Degeneration

Eine Korrelation zum Gewicht lag nicht vor. (siehe Abb. 37)

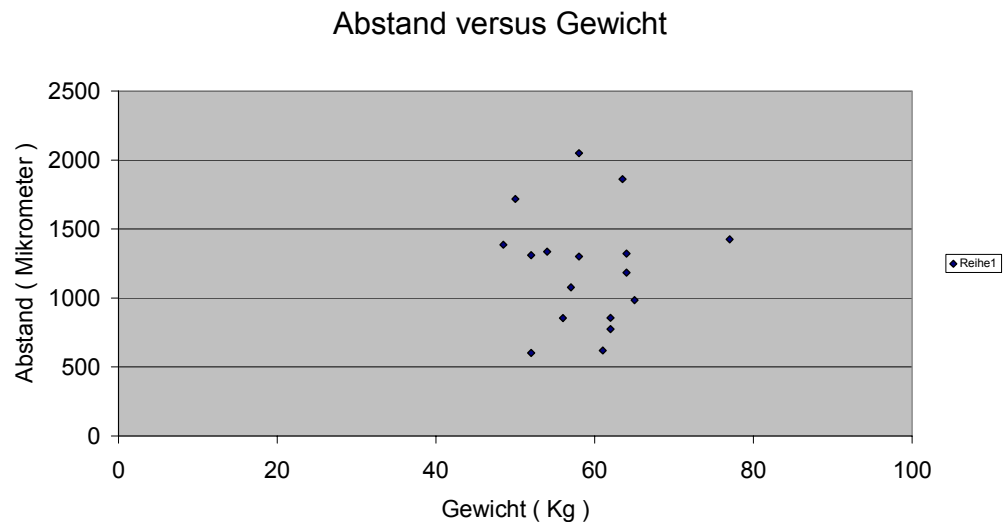


Abb. 37

Zusammenfassung der Resultate :

- Ein Tier wurde aufgrund von operativen Komplikationen euthanasiert.
- ASD lag ausserhalb der Anulotomie in 100 % der Fälle (n = 12).
- Die restlichen 24 Tiere zeigten keine neurologischen Probleme.
- ASD lässt sich mikroradiographisch nicht jedoch radiographisch darstellen.
- Ein Serom als postoperative Komplikation trat bei 2 von 25 operierten Tieren auf.
- Die Anulotomie (kraterförmige Einziehung) bei den Kontrolltieren ist nach 7 Monaten nicht mehr sichtbar.
- ASD war in der Muskulatur in 58,3 % der Fälle nachweisbar.
- Die ASD gruppe zeigte vermehrt fibrotisches Gewebe und Makrophagen.
- Zeichen einer entzündlichen Reaktion in der Muskulatur konnten nicht beobachtet werden.
- Entzündungsmediatoren konnten nach 3 und 6 Monaten immunhistochemisch nicht vermehrt nachgewiesen werden.

- PCR-analytisch konnten eine Erhöhung der Entzündungsmediatoren mit Ausnahme von Interleukin 1 in der Kontrollgruppe nach 6 Monaten bei allen Tieren nachgewiesen werden.
- Drei Monate nach der Operation stellten sich die Werte der Implantationsgruppe vergleichsweise höher dar bei Interleukin 1, Interleukin 6 und der Cyclooxygenase 2. Eine unwesentliche Erhöhung in der Kontrollgruppe konnte zu diesem Zeitpunkt bei der induzierbaren Stickoxidsynthetase nachgewiesen werden.
- Interleukin 1 und die induzierbare Stickoxidsynthetase zeigten zu jeder Zeit eine höhere Expression in der Implantationsgruppe.
- Interleukin 6 wies nach 6 und 7 Monaten eine erhöhte Expression in der Kontrollgruppe auf.
- Die Cyclooxygenase 2 wies nach 7 Monaten eine deutlich erhöhte Expression in der Kontrollgruppe auf
- Spuren von ASD zwischen den AF Lamellen konnten in 41,6 % der Fälle nachgewiesen werden. Der AF zeigte dabei Disorganisation und Gefäßeinsprossung.
- Deutlich degenerative Veränderungen der Bandscheibe treten nach 7 Monaten auf.
- Die Veränderungen der Bandscheibe sind ausgeprägter in der Kontrollgruppe.
- Der Nukleus pulposus ist von den degenerativen Veränderungen am stärksten betroffen.
- Eine Annäherung des Zwischenwirbelraums in Abhängigkeit zur postoperativen Periode oder zur Implantation des ASD konnte nicht beobachtet werden.
- Das Alter der Tiere scheint einen tendenziellen Einfluss auf die Degeneration zu haben.
- Das Körpergewicht scheint keinen Einfluss auf die Degeneration der Bandscheibe zu haben.

Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine Versiegelung des Annulus fibrosus mit einem Polymer (Annulus Sealing Device) nach einer Nukleotomie beim Bandscheibenvorfall nicht möglich war. Das verwendete Biomaterial wurde von der ursprünglichen Lokalisation in der Bandscheibe in den meisten Fällen aus dem Zwischenwirbelspalt herausgedrückt und legte sich – zwar reaktionslos – an die Wirbelkörper an. Obwohl die ursprüngliche gewünschte Wirkung, nämlich ein mechanischer Verschluss der Bandscheibe und damit eine Verhinderung einer Reherniation nicht eintrat, wurde dennoch beobachtet, daß die Degradierung der Bandscheibe etwas verzögert wurde im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Schafe dienten als Versuchstiere, da die biomechanischen Ähnlichkeiten zwischen der Schafwirbelsäule und der Wirbelsäule des Menschen schon in früheren Arbeiten bewiesen werden konnten ^{173, 174}. Ähnliche Bewegungsspannbreiten der isolierten Wirbelsäulen hinsichtlich axialer Rotation, Flexion und Extension, sowie lateraler Biegung wurden gefunden, so dass die Schafwirbelsäule demnach als Modell für Menschen akzeptiert werden kann. Jedoch zeigt kein Tier, weder Schaf noch teilweise bipedische Tiere wie Primaten oder Känguruhs, die gleichen Bewegungsmuster wie der Mensch *in vivo*. Dieser Unterschied muss in jedem Falle in Betracht gezogen werden.

Die Operation der Tiere verlief planmässig in 24 Tieren, der Zugang ist für einen erfahrenen Chirurgen leicht zu reproduzieren. Im Falle der intraoperativen Penetration der Rückenmarks bei einem Tier halten wir für diesen Zwischenfall die Grösse der Instrumente für ausschlaggebend. Der Zwischenwirbelraum eines Schafe ist deutlich schmaler als der eines Menschen. Der Rongeur Caspar 2.0, der in dieser Studie benutzt wurde, ist für Bandscheibenfenestrationen beim Schaf etwas zu groß. Für weitere Operationen empfiehlt sich ein kleineres

Instrumentarium, das eventuell speziell hergestellt werden sollte Dieses Schaf wurde sofort euthanasiert und bei den anderen Schafen ergaben sich diese Probleme nicht. Es ergaben sich für den Versuch keine gravierenden Nachteile.

Die Bandscheibe war aufgrund von fibrotischen Zubildungen, teilweise nur schwer zu identifizieren. Die erschwerte Identifikation und das Unwissen über die Dislokation des ASD zum Zeitpunkt des Zurechtsägens führten in einigen Fällen zu einem Durchtrennen der Bandscheibe. Demzufolge war die Ausmessung des Zwischenwirbelabstandes am histologischen Präparat nicht an allen Präparaten möglich. Daher empfiehlt sich ein transversales Abtrennen des Wirbelkanals. Dieses ermöglicht eine gute Identifikation der Bandscheibe und eine bessere Planung der weiteren Schnittführung.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bei der Präparation der Dünnschnitte, indem die unterschiedliche Härte der Gewebe (Knochen, Bandscheibe und Biomaterial) beim Schneiden mit dem Mikrotom das Gewebe beim Übergang der Gewebe teilweise auseinander gerissen wurde oder Falten in der Bandscheibe entstanden. Diese Artefakte konnten aber durch den Vergleich mit den Dickschnitten leicht identifiziert und damit eine Verfälschung der Interpretation verhindert werden. Die Dünnschnitte dienten lediglich dazu, die Kollagenfasern der Ligamente, bzw, den Kern des Nukleus pulposus und die zelluläre Reaktion des Bandscheibengewebes auf das Biomaterial zu bestimmen. Die Lokalisation des Biomaterials wurde ausschließlich anhand der Schleifschnitte vorgenommen.

Die Auswertung der Fibrose der Lendenwirbelsäule zeigte Abweichungen in den Ergebnissen der Fibrose in der Muskulatur beim makro- und mikroskopischen Vergleich. Die Bedingung für die Entnahme der Muskelprobe war, dass die Muskulatur der Anulotomie anliegt. Es wurden vorrangig Anzeichen einer Muskeldegeneration und einer Entzündung des Gewebes beurteilt. Bei der Entnahme der Probe ist es durchaus möglich, dass variierende Anteile der Bandscheibenfibrose mit entnommen wurden. Die makroskopisch beurteilte

Fibrose stellt aus diesem Grunde sicherlich die objektivere Auswertung dar im Vergleich zu den mikroskopischen Befunden.

Die in der mikroskopischen Auswertung befundete Muskulatur zeigte Fibroblasten und Makrophagen, welche jedoch nur morphologisch identifiziert wurden. Ito⁷¹ beschrieb in Studien mit CD68 Markern, dass die spindelförmigen als Fibroblasten interpretierten Zellen später als Makrophagen identifiziert wurden. In der vorliegenden Studie wurden diese Marker nicht verwendet, bzw. eine Entwicklung derselben konnte somit nicht weiter verfolgt werden. Es kann aber aus diesem Grunde wahrscheinlich von einer erhöhten Dunkelziffer an Makrophagen ausgegangen werden..

Osti et al.¹³⁴ beschrieben in ihrer Studie degenerative Veränderungen der Bandscheibe im Schafmodell nach einer Annulusinzision, welche parallel den Endplatten vorgenommen wurde und den den Nukleus pulposus nicht involvierte. Sie bewiesen, dass nur der äussere AF eine Heilungstendenz besitzt und belegten das Auftreten von Nukleusdegeneration (charakterisiert als Verlust der Definition zwischen AF und NP, Dehydratation und die Anwesenheit von Spalten im NP), Annäherung des Zwischenwirbelraums und die Erscheinung von Osteophyten. Diese degenerativen Veränderungen stellten sich nach 6 Monaten in ca. 50 % der Tiere dar und waren nach 8 Monaten bei fast 100 % nachweisbar.

In dieser Studie wurden als Veränderungen des Nukleus hauptsächlich eine inhomogene Erscheinung und eine Verlagerung innerhalb des AF gefolgt von Chondronbildung und Rissen im Nukleus nachgewiesen. Eine verminderte Definition zwischen AF und NP konnte nur in 4.76 % der Fälle beobachtet werden. Eine Annäherung des Zwischenwirbelraums oder die Erscheinung von Osteophyten konnte nicht nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung für die insgesamt geringeren pathologischen Veränderungen in dieser Studie ist, dass durch die partielle Entfernung des NP

weiteren degenerativen Prozesse vorgegriffen wurde. Ein anderer Grund wäre die subjektive Auswertung, oder eine andere Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte das Alter und die Rasse der Tiere sein. Osti et al verwendeten 2 Jahre alte Merinoschafe, wir hingegen operierten Weisse Alpenschafe in einem Alter von 2 bis 4 Jahren (durchschnittlich 3.28 Jahre).

Hanley et al.⁴⁸ beschrieben eine altersabhängige Annäherung des Zwischenwirbelraums beim Menschen. Eine klare Korrelation zur postoperativen Periode konnten sie nicht nachweisen. Eine leichte Annäherung wurde nach 36,5 Monaten, eine mässige Annäherung wurde nach 44,1 Monaten und eine hochgradige Annäherung nach 35,4 Monaten postoperativ nachgewiesen.

Generell wird die Bandscheibe in den meisten Fällen makroskopisch nach dem „Thompson Grading Schema“ beurteilt. Es gibt insgesamt nur sehr wenige Erkenntnisse über histologische Veränderungen in der Literatur beschrieben.

Griess et al.³⁹ entwickelten ein Grading schema für die histologische Auswertung von Bandscheibendegenerationen beim Menschen. Sie beurteilten den AF unter anderen anhand der Anulusinsertion an der EP und anhand dem Auftreten von radiären Rissen, sowie Reparaturprozessen an den Rissen. In der Auswertung der Bandscheibenpräparate dieser Studie konnten keine Veränderungen an der Anulusinsertion beobachtet werden, ebensowenig wie periphere Risse mit Reparaturreaktion. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass in unserer Studie Risse als Schleifartefakte missinterpretiert wurden. Ein Riss wurde angenommen, wenn er makroskopisch im PMMA Block erkennbar war und mikroskopisch ebenfalls bestätigt werden konnte. Den Nukleus pulposus beurteilten Griess et al. u.a. anhand von Spaltenbildung, Chondronen, Nekrose und zystischer Degeneration. Wir konnten weder zystische Degeneration noch Nekrosen im NP nachweisen. Die Endplatte klassifizierten Griess et al. anhand der Anzahl der Gefässkanäle, wobei sie eine Degeneration von Grad 3 u.a. mit dem Auftreten von vielen Gefässkanälen beschrieben. Des weiteren orientierten sie sich anhand des Auftretens von Fissuren und Chondronbildung, sowie der Verbindung zwischen Endplatte und Knochen und Ausdünnungen der

kalzifizierten Zone. Die Endplatten in dieser Studie zeigten nur in einem Fall eine Querrissur und die Verbindung zum Knochen war immer intakt. Die Zahl der Gefässkanäle in der EP reichte von 4 bis 17 Gefässkanälen. Jedoch zeigte das Präparat mit 17 Gefässkanälen eine regelmässige kalzifizierte Zone und kaum Chondronbildung. Da „viele Gefässkanäle“ nicht definiert werden konnten, nahmen wir dieses als zweitrangiges Kriterium und orientierten uns hauptsächlich an Erscheinung der Kalzifikationszone. Im Studienreport von Griess et al. wurden an der Endplatte noch die Erscheinung der knorpeligen Zone beurteilt, sowie die Ränder und der subchondrale Knochen. Die knorpelige Zone war teilweise in den Präparaten ersichtlich, ihre Abwesenheit stand jedoch in keinem Zusammenhang mit anderen degenerativen Veränderungen. Vergleichsproben von nicht operierten Schafen zeigten ebenfalls eine Abwesenheit der knorpeligen Zone. Wir gehen davon aus, dass der Knorpel durch den Säge- und Schleiffvorgang im unterschiedlichen Gewebe entfernt wurde und bezogen deshalb die knorpelige Zone als Kriterium in die Auswertung nicht mit ein. Griess et al. bewerteten Schmorlknötchen, Osteophyten, Knochenremodelling und Fibrose im Knochenmark als degenerative Veränderungen des subchondralen Knochens. In dieser Studie wurden keine dieser Veränderungen nachgewiesen, so daß wir die Ränder und den subchondralen Knochen in unserem modifizierten Schema nicht mit einbezogen. Moore et al.¹¹⁴ beschrieben Knochenremodelling des subchondralen Knochens nach den NP nicht involvierenden Annulusinzisionen, wobei sie diese Veränderungen an 2-jährigen Merinoschafen mittels Computeranalyse nachwiesen. Es liegen nach unserem Wissen keine Literaturangaben über Schmorlknötchen beim Schaf vor. Möglich wäre dass intravertebrale Herniationen (Schmorlknötchen)ein rein bipedisches Problem sind.

Eine weitere Modifikation des Schemas von Griess et al. sollte für das Schafmodell nicht ausgeschlossen werden, damit eine genauere Definition der Veränderungen und eine nachvollziehbare Klassifikation gewährleistet werden kann.

Auffällig ist, daß die erhobenen Werte des Zeitraums 6 Monate postoperativ von den anderen Werten häufig erheblich abwichen, wie z.B. eine erhöhte Fibrozytenzahlen in der Muskulatur, massivere Muskeldegeneration, verminderte Degeneration der Bandscheibe, oder eine verminderte Fibrose der Bandscheibe. Eine Erklärung wäre hierfür die subjektive Auswertung, jedoch auch objektive Auswertungen wie der Abstand des Zwischenwirbelraums zeigen um die 6 Monate abweichende Ergebnisse. Diese Gruppe von Tieren wurde an 2 Tagen mit einer Woche Abstand zwischen Operationstagen operiert. Eine Möglichkeit wäre damit die Tagesform des Operators. Operationszwischenfälle lagen jedoch nicht vor und entnommene Teile des Nukleus pulposus wurden eindeutig als solche identifiziert, so daß diese Möglichkeit eher für unwahrscheinlich gilt und eher wirkliche Abweichungen dafür verantwortlich gemacht werden.

Die Ergebnisse der Realtime- PCR zeigten hohe Standardabweichungen, die wir auf interindividuelle Unterschiede zurückführen. Eine Möglichkeit diesem Problem vorzubeugen wäre die Implantation und Kontrolloperation am selben Tier an verschiedenen Zwischenwirbelräumen durchzuführen. Auf diese Weise könnten die Auswirkungen des Implantates mit Vergleich innerhalb des Individuums untersucht werden. Jedoch bedeutet ein solches Procedere eine zweifache Instabilität der Wirbelsäule, wobei eine negative Beeinflussung der Ergebnisse nicht auszuschliessen wäre.

Eine mögliche Erklärung für die Dislokation des Annular Sealant Devices ist die Lagerung des Tieres während der Operation. Für einen optimalen Zugang zur Bandscheibe wird sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin die Wirbelsäule soweit wie möglich aufgebogen um die betreffende Bandscheibe so gut wie möglich dar zustellen. Bei diesem Vorgang werden die Anulusfasern gedehnt und der Zwischenlamellenraum wird komprimiert. Wenn die Wirbelsäule nach der Operation wieder in physiologischer Haltung vorliegt, ist es vorstellbar, dass das ASD heraus gedrückt wird. Dieses Problem könnte durch eine erhöhte

Bioadhäsion des Materials behoben werden. Studien zu einer zweiten Generation des Annular Sealant Device mit erhöhter Bioadhäsion werden zur Zeit (2002) mit viel versprechenden Resultaten durchgeführt.

Reherniationen beim Hund liegen mit einer sehr geringen Inzidenz vor (1.8%), so daß ein Einsatz von ASD hierfür nicht gerechtfertigt ist. Jedoch könnte ASD seine Anwendung in der Veterinärmedizin finden, um Bandscheibeninstabilitäten im Anschluss an Fenestrationsen, auch prophylaktisch an mehreren Segmenten durchgeführt, auszugleichen.^{24, 99, 104}

Zusammenfassung

Bei dieser Studie handelt es sich um einen *in vivo* Versuch im Schafmodell, um die Bioverträglichkeit und Integrität des ASD zu testen. Bei 25 Schafen wurde über einen retroperitonealen Zugang der Anulus fibrosus zwischen dem zweiten und dritten Lendenwirbeln inzidiert und Teile des Nukleus pulposus entfernt. Danach wurde bei 16 Tieren 300 µl des ASD in den fenestrierten Anulus fibrosus injiziert. Nach einer postoperativen Periode von 3, 5, 7 und 9 Monaten erfolgte die Schlachtung der Tiere. Die Lendenwirbelsäule wurde bei der Schlachtung makroskopisch evaluiert. Das Rückenmark wurde immunhistochemisch und PCR-analytisch auf die Entzündungsmediatoren PGE₂, iNOS, TNF α, COX 2, IL-1, und IL-6 untersucht.

Proben der anliegenden Muskulatur wurden histologisch auf Entzündungs- und Degenerationsanzeichen untersucht. Die Bandscheibe wurde histologisch auf die Integrität des ASD, sowie Anzeichen von Degeneration und Entzündung untersucht.

Die makroskopische Evaluation der Wirbelsäule zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Implantationsgruppe und der Kontrollgruppe hinsichtlich Fibrose oder Rötung des Wirbelkanals. Die Anulotomie konnte in der Kontrollgruppe nach 7 Monaten nicht mehr gesehen werden. Immunhistochemisch konnten nur geringste Mengen von Entzündungsmediatoren in beiden Gruppen nachgewiesen werden. PCR-analytisch zeigten beide Gruppen eine erhöhte Expression der Entzündungsmediatoren mit einer ausgeprägten Standardabweichung. Vergleichsweise höhere Werte in der Implantationsgruppe konnten von IL-1 und iNOs nachgewiesen werden. ASD war in der Muskulatur in 58.3 % der Fälle nachweisbar, Anzeichen einer Entzündung konnten nicht beobachtet werden. Es konnte maximal eine mittelgradige Degeneration der Muskulatur in der Kontrollgruppe beobachtet werden. Im Bandscheibenpräparat konnte das Biomaterial ausserhalb des Anulus fibrosus in 100 % der Fälle gefunden werden. Spuren von ASD innerhalb des Anulus fibrosus wurden in 41,6 % der Fälle gesehen. Degenerative Veränderungen waren ausgeprägter in der Kontrollgruppe, wobei der Nukleus pulposus am stärksten von den Veränderungen betroffen war. Anzeichen einer Entzündung der Bandscheibe konnten weder in der Implantationsgruppe noch in der Kontrollgruppe beobachtet werden.

Das in dieser Studie getestete Biomaterial Annular Sealant Device (ASD) zeigt eine gute Bioverträglichkeit, erbrachte jedoch hinsichtlich der Integrität des Materials im Anulus fibrosus nicht die gewünschte biomechanische Festigkeit.

Summary

This study was performed as an in vivo trial using a sheep model to test the biocompatibility and integrity of ASD. A retroperitoneal approach to the spine was performed on 25 sheep under general anaesthesia. In each case part of the nucleus pulposus was removed from the disc between the second and third lumbar vertebrae. In 16 of the 25 sheep ca. 300 µl of ASD was injected into the fenestrated anulus fibrosus, before closure, the remaining 9 forming the control group. The animals were then slaughtered after a post-operative period of 3, 5, 6, 7 and 9 months. The surgical site was examined macroscopically and samples from the spinal cord and lumbar muscles adjacent to the site of the anulotomy taken. These samples were evaluated using immunohistochemistry and PCR analysis for the presence of inflammatory mediators PGE₂, iNOS, TNF α, COX 2, IL-1 and IL-6 and histologically respectively. The intervertebral disc itself was examined microscopically for signs of degeneration and inflammation and the integrity of the ASD implant assessed. No significant difference could be detected between the implant and the control group macroscopically. The anulotomy was no longer visible in the control group after 7 months. Immunohistochemistry showed low levels inflammatory mediators in both groups. PCR analysis showed significantly higher levels of inflammatory mediators in both groups. Standard deviation was high. Comparatively higher values of IL-1 and iNOS were detected in the implant group. ASD was detected in the muscle without signs of inflammation in 58,3%. Moderate signs of muscle degeneration were only observed in the control group. Preparation of the intervertebral disc showed the biomaterial outside the anulus fibrosus in 100% of the cases, Traces of ASD in the anulus fibrosus have been found in 41,6% of the cases, with degenerative changes being more significant in the control group. The nucleus pulposus had highest degenerative scores. Signs of inflammation were not observed in either the implant group or the control group.

It was demonstrated that ASD has good biocompatibility, but an insufficient biomechanical stability in the annulus fibrosus

Referenzen

1. Aguiar, D.J., S.L. Johnson, and T.R. Oegema, *Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis*. Exp Cell Res, 1999. **246**(1): p. 129-37.
2. Ahlgren, B.D., et al., *Effect of anular repair on the healing strength of the intervertebral disc: a sheep model*. Spine, 2000. **25**(17): p. 2165-70.
3. Antoniou, J., et al., *The human lumbar endplate. Evidence of changes in biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, aging, and degeneration*. Spine, 1996. **21**(10): p. 1153-61.
4. Antoniou, J., et al., *The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration*. J Clin Invest, 1996. **98**(4): p. 996-1003.
5. Athanasou, N.A., et al., *Glycosaminoglycans in intervertebral disc amyloid deposits*. Eur Spine J, 1995. **4**(5): p. 308-12.
6. Bao, Q.B., et al., *The artificial disc: theory, design and materials*. Biomaterials, 1996. **17**(12): p. 1157-67.
7. Battie, M.C., et al., *1995 Volvo Award in clinical sciences. Determinants of lumbar disc degeneration. A study relating lifetime exposures and magnetic resonance imaging findings in identical twins*. Spine, 1995. **20**(24): p. 2601-12.
8. Boos, N., et al., *Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during ageing and degeneration*. Histochem Cell Biol, 1997. **108**(6): p. 471-80.
9. Bray, J.P. and H.M. Burbidge, *The canine intervertebral disk. Part Two: Degenerative changes--nonchondrodystrophoid versus chondrodystrophoid disks*. J Am Anim Hosp Assoc, 1998. **34**(2): p. 135-44.
10. Bray, J.P. and H.M. Burbidge, *The canine intervertebral disk: part one: structure and function*. J Am Anim Hosp Assoc, 1998. **34**(1): p. 55-63.
11. Bryant, C.E. and J. Elliott, *Nitric Oxide: Friend or Foe ?* Equine Veterinary Education, 1994. **6**(2): p. 59-64.
12. Buckwalter, J.A., *Aging and degeneration of the human intervertebral disc*. Spine, 1995. **20**(11): p. 1307-14.
13. Buttery, L., et al. *Nitric Oxide Dependent and Independent Induction of Prostaglandin Synthesis in Osteoblasts*. in *Sixth Workshop on Cells and Cytokines in Bone and Cartilage*. 1996. Davos, Switzerland: Elsevier Science Inc.
14. Callard R.E., G.A.J.H., *The Cytokine Facts Book*. 1994, London: Academic Press, Harcourt Braca & Company.
15. Caron, J.P., et al., *Chondroprotective Effect of Intraarticular Injections of Interleukin-1 Receptor Antagonist in Experimental Osteoarthritis*. Arthritis and Rheumatism, 1996. **39**(9, September): p. 1535-1544.
16. Carreon, L.Y., et al., *Histologic changes in the disc after cervical spine trauma: evidence of disc absorption*. J Spinal Disord, 1996. **9**(4): p. 313-6.
17. Carreon, L.Y., et al., *Neovascularization induced by anulus and its inhibition by cartilage endplate. Its role in disc absorption*. Spine, 1997. **22**(13): p. 1429-34; discussion 1446-7.
18. Chandraraj, S., C.A. Briggs, and K. Opeskin, *Disc herniations in the young and end-plate vascularity*. Clin Anat, 1998. **11**(3): p. 171-6.
19. Chiba, K., et al., *Metabolism of the extracellular matrix formed by intervertebral disc cells cultured in alginate*. Spine, 1997. **22**(24): p. 2885-93.
20. Cooper, R.G., et al., *Herniated intervertebral disc-associated periradicular fibrosis and vascular abnormalities occur without inflammatory cell infiltration*. Spine, 1995. **20**(5): p. 591-8.
21. Coskun, E., et al., *Relationships between epidural fibrosis, pain, disability, and psychological factors after lumbar disc surgery*. Eur Spine J, 2000. **9**(3): p. 218-23.
22. Crean, J.K., et al., *Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: role in disc*

- degeneration and scoliosis. *Spine*, 1997. **22**(24): p. 2877-84.
23. Cudia, S.P. and J.M. Duval, *Thoracolumbar intervertebral disk disease in large, nonchondrodystrophic dogs: a retrospective study*. *J Am Anim Hosp Assoc*, 1997. **33**(5): p. 456-60.
24. Dhupa, S., N. Glickman, and D.J. Waters, *Reoperative neurosurgery in dogs with thoracolumbar disc disease*. *Vet Surg*, 1999. **28**(6): p. 421-8.
25. Doita, M., et al., *Immunohistologic study of the ruptured intervertebral disc of the lumbar spine*. *Spine*, 1996. **21**(2): p. 235-41.
26. Doita, M., et al., *Influence of macrophage infiltration of herniated disc tissue on the production of matrix metalloproteinases leading to disc resorption*. *Spine*, 2001. **26**(14): p. 1522-7.
27. Evans, C.H., M. Stefanovic-Racic, and J. Lancaster, *Nitric Oxide and Its Role in Orthopaedic Disease*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1995. **312**(March): p. 275-294.
28. Fardon, D.F. and P.C. Milette, *Nomenclature and classification of lumbar disc pathology. Recommendations of the Combined task Forces of the North American Spine Society, American Society of Spine Radiology, and American Society of Neuroradiology*. *Spine*, 2001. **26**(5): p. E93-E113.
29. Fennell, A.J., A.P. Jones, and D.W. Hukins, *Migration of the nucleus pulposus within the intervertebral disc during flexion and extension of the spine*. *Spine*, 1996. **21**(23): p. 2753-7.
30. Fraser, R.D., Bleasel, J.F., Moskowitz R.W., *Spinal Degeneration: Pathogenesis and Medical Management*, in *The Adult Spine: Principles and Practice*, J.W. Frymoyer, Editor. 1997, Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 735-757.
31. Fritsch, E.W., J. Heisel, and S. Rupp, *The failed back surgery syndrome: reasons, intraoperative findings, and long-term results: a report of 182 operative treatments*. *Spine*, 1996. **21**(5): p. 626-33.
32. Fujita, I., et al. *Inhibition of Neutrophil-Mediated Chondrocyte Cytotoxicity by Nitric Oxide Generated by Articular Chondrocytes; a Novel Protective Mechanism of the Cartilage Degradation*. in *Transactions of the 40th Annual Meeting*. 1994. New Orleans: Orthopaedic Research Society.
33. Fujita, Y., N.A. Duncan, and J.C. Lotz, *Radial tensile properties of the lumbar annulus fibrosus are site and degeneration dependent*. *J Orthop Res*, 1997. **15**(6): p. 814-9.
34. Gibson, K.T., H. Hodge, and T. Whitem, *Inflammatory Mediators in Equine Synovial Fluid*. *Australian Veterinary Journal*, 1996. **73**(4, April): p. 148-151.
35. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Skeletal Tissue Response to Cytokines*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1990. **258**(September): p. 245-278.
36. Goupille, P., et al., *Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration?* *Spine*, 1998. **23**(14): p. 1612-26.
37. Goupille, P., et al., *The role of inflammation in disk herniation-associated radiculopathy*. *Semin Arthritis Rheum*, 1998. **28**(1): p. 60-71.
38. Grant, J.P., T.R. Oxland, and M.F. Dvorak, *Mapping the structural properties of the lumbosacral vertebral endplates*. *Spine*, 2001. **26**(8): p. 889-96.
39. Gries, N.C., et al., *Early histologic changes in lower lumbar discs and facet joints and their correlation*. *Eur Spine J*, 2000. **9**(1): p. 23-9.
40. Gronblad, M., et al., *A controlled biochemical and immunohistochemical study of human synovial-type (group II) phospholipase A2 and inflammatory cells in macroscopically normal, degenerated, and herniated human lumbar disc tissues*. *Spine*, 1996. **21**(22): p. 2531-8.
41. Gruber, H.E. and E.N. Hanley, Jr., *Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls*. *Spine*, 1998. **23**(7): p. 751-7.
42. Gruber, H.E., H.J. Norton, and E.N. Hanley, Jr., *Anti-apoptotic effects of IGF-I and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro*. *Spine*, 2000. **25**(17): p. 2153-7.

43. Gu, W.Y., et al., *The anisotropic hydraulic permeability of human lumbar anulus fibrosus. Influence of age, degeneration, direction, and water content.* Spine, 1999. **24**(23): p. 2449-55.
44. Gu, W.Y., et al., *Streaming potential of human lumbar anulus fibrosus is anisotropic and affected by disc degeneration.* J Biomech, 1999. **32**(11): p. 1177-82.
45. Habtemariam, A., et al., *Immunocytochemical localization of immunoglobulins in disc herniations.* Spine, 1996. **21**(16): p. 1864-9.
46. Haldimann, D., *Beschreibung ASD Biomaterial*, B. Brand, Editor. 2001.
47. Handa, T., et al., *Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc.* Spine, 1997. **22**(10): p. 1085-91.
48. Hanley, E.N., Jr. and D.E. Shapiro, *The development of low-back pain after excision of a lumbar disc.* J Bone Joint Surg Am, 1989. **71**(5): p. 719-21.
49. Haro, H., et al., *Sequential dynamics of monocyte chemotactic protein-1 expression in herniated nucleus pulposus resorption.* J Orthop Res, 1997. **15**(5): p. 734-41.
50. Harrington, J., Jr., et al., *The relation between vertebral endplate shape and lumbar disc herniations.* Spine, 2001. **26**(19): p. 2133-8.
51. Harvey, W., et al., *Evidence for Fibroblasts as the Major Source of Prostaglandin Synthesis in Dental Cyst in Man.* Archs oral Biol., 1984. **29**(3): p. 223-229.
52. Hasegawa, T., et al., *The effect of age on inflammatory responses and nerve root injuries after lumbar disc herniation: an experimental study in a canine model.* Spine, 2000. **25**(8): p. 937-40.
53. Hasegawa, T., et al. *Inflammatory membrane surrounding herniated discin lumbar epidural space.* in *Annual meeting of the North American Spine Society*. 1997. New York.
54. Hashizume, H., et al., *Histochemical demonstration of nitric oxide in herniated lumbar discs. A clinical and animal model study.* Spine, 1997. **22**(10): p. 1080-4.
55. Haughton, V.M., et al., *Flexibility of lumbar spinal motion segments correlated to type of tears in the annulus fibrosus.* J Neurosurg, 2000. **92**(1 Suppl): p. 81-6.
56. Herron, L., *Recurrent lumbar disc herniation: results of repeat laminectomy and discectomy.* J Spinal Disord, 1994. **7**(2): p. 161-6.
57. Hill, P. and M. Meikle. *Mechanism of Action of Interleukin-11 in Bone Resorption.* in *Sixth Workshop on Cells and Cytokines in Bone and Cartilage*. 1996. Davos, Switzerland: Elsevier Science Inc.
58. Holt, I., et al., *Prostaglandin E2 Stimulates the Production of Interleukin-6 by Neonatal Mouse Parietal Bones.* Bone and Mineral, 1994. **25**: p. 47-57.
59. Hoyland, J.A., A.J. Freemont, and M.I. Jayson, *Intervertebral foramen venous obstruction. A cause of periradicular fibrosis?* Spine, 1989. **14**(6): p. 558-68.
60. Hsu, E.W. and L.A. Setton, *Diffusion tensor microscopy of the intervertebral disc anulus fibrosus.* Magn Reson Med, 1999. **41**(5): p. 992-9.
61. Hukkanen, M., et al. *Murine, Rat and Human Osteoblasts Express Inducible Nitric Oxide Synthase which in Turn Mediates The Cell Function.* in *The Second Meeting on the Biology of Nitric Oxide*. 1992. London: Portland Press.
62. Humzah, M.D. and R.W. Soames, *Human intervertebral disc: structure and function.* Anat Rec, 1988. **220**(4): p. 337-56.
63. Hutton, W.C., et al., *The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism.* Spine, 1999. **24**(15): p. 1507-15.
64. Hutton, W.C., et al., *The effect of compressive force applied to the intervertebral disc in vivo. A study of proteoglycans and collagen.* Spine, 1998. **23**(23): p. 2524-37.
65. Iatridis, J.C., et al., *Alterations in the mechanical behavior of the human lumbar nucleus pulposus with degeneration and aging.* J Orthop Res, 1997. **15**(2): p. 318-22.
66. Iatridis, J.C., et al., *Is the nucleus pulposus a solid or a fluid? Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the*

- human intervertebral disc. *Spine*, 1996. **21**(10): p. 1174-84.
67. Igarashi, T., et al., 2000 *Volvo Award winner in basic science studies: Exogenous tumor necrosis factor-alpha mimics nucleus pulposus-induced neuropathology. Molecular, histologic, and behavioral comparisons in rats.* *Spine*, 2000. **25**(23): p. 2975-80.
68. Ishihara, H., et al., *Proteoglycan synthesis in the intervertebral disk nucleus: the role of extracellular osmolality.* *Am J Physiol*, 1997. **272**(5 Pt 1): p. C1499-506.
69. Ishimi, Y., et al., *IL-6 is Produced by Osteoblasts and Induces Bone Resorption.* *The Journal of Immunology*, 1990. **10**(November): p. 3297-3303.
70. Ito, A., et al., *Cyclooxygenase Inhibitors Augment the Production of Pro-Matrix Metalloproteinase 9 (Progelatinase B) in Rabbit Articular Chondrocytes.* *FEBS Letters*, 1995. **360**: p. 75-79.
71. Ito, T., et al., *Histologic evidence of absorption of sequestration-type herniated disc.* *Spine*, 1996. **21**(2): p. 230-4.
72. Jensen, T.T., et al., *First-time operation for lumbar disc herniation with or without free fat transplantation. Prospective triple-blind randomized study with reference to clinical factors and enhanced computed tomographic scan 1 year after operation.* *Spine*, 1996. **21**(9): p. 1072-6.
73. Jonsson, B. and B. Stromqvist, *Clinical characteristics of recurrent sciatica after lumbar discectomy.* *Spine*, 1996. **21**(4): p. 500-5.
74. Kanemoto, M., et al., *Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 human intervertebral discs.* *Spine*, 1996. **21**(1): p. 1-8.
75. Kanerva, A., et al., *Inflammatory cells in experimental intervertebral disc injury.* *Spine*, 1997. **22**(23): p. 2711-5.
76. Kang, J.D., et al., *Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2.* *Spine*, 1996. **21**(3): p. 271-7.
77. Kang, J.D., et al., *Toward a biochemical understanding of human intervertebral disc degeneration and herniation. Contributions of nitric oxide, interleukins, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases.* *Spine*, 1997. **22**(10): p. 1065-73.
78. Kauppila, L.I., et al., *Disc degeneration/back pain and calcification of the abdominal aorta. A 25-year follow-up study in Framingham.* *Spine*, 1997. **22**(14): p. 1642-7; discussion 1648-9.
79. Kawaguchi, S., et al., *Immunophenotypic analysis of the inflammatory infiltrates in herniated intervertebral discs.* *Spine*, 2001. **26**(11): p. 1209-14.
80. Kawakami, M., et al., *Role of leukocytes in radicular pain secondary to herniated nucleus pulposus.* *Clin Orthop*, 2000(376): p. 268-77.
81. Kikuchi, T., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in the intervertebral disc. A histologic experimental model.* *Spine*, 1998. **23**(10): p. 1091-9.
82. Knapp, P., Hewett, Bojrab, A *Retrospective Study of Thoracolumbar disk Fenestration in Dogs Using a Ventral Approach: 160 cases (1976 to 1986).* *JOURNAL of the American animal hospital Association*, 1990. **26**: p. 543-549.
83. Komori, H., et al., *The natural history of herniated nucleus pulposus with radiculopathy.* *Spine*, 1996. **21**(2): p. 225-9.
84. Kondo, S., et al., *The Effects of Nitric Oxide on Chondrocytes and Lymphocytes.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993. **197**(3): p. 1431-1437.
85. Kostuik, *Clinical Efficacy and Outcome in the Diagnosis and Treatment of Low Back Pain.* 1992, New York: Raven Press. 259-270.
86. Kumaresan, S., et al., *Morphology of young and old cervical spine intervertebral disc tissues.* *Biomed Sci Instrum*, 2000. **36**: p. 141-6.
87. Kumei, Y., et al., *Microgravity Induces Prostaglandin E2 and Interleukin-6 Production in Normal Rat Osteoblasts: Role in Bone Demineralization.* *Journal of Biotechnology*, 1996. **47**: p. 313-324.

88. Kurihara, N., et al., *IL-6 Stimulates Osteoclast-like Multinucleated Cell Formation in Longterm Human Marrow Cultures by Inducing IL-1 Release*. The Journal of Immunology, 1990. **144**(11): p. 4226-4230.
89. Kurunlahti, M., et al., *Association of atherosclerosis with low back pain and the degree of disc degeneration*. Spine, 1999. **24**(20): p. 2080-4.
90. Laus, M., et al., *Recurrent lumbar disc herniation: what recurs? (A morphological study of recurrent disc herniation)*. Chir Organi Mov, 1993. **78**(3): p. 147-54.
91. Leutenegger, C.M., et al., *Quantitative real-time PCR for equine cytokine mRNA in noncalcified bone tissue embedded in methyl methacrylate*. Calcif Tissue Int, 1999. **65**(5): p. 378-83.
92. Linkhart, T.A., et al., *Interleukin-6 Messenger RNA Expression and Interleukin-6 Protein Secretion in Cells Isolated from Normal Human Bone: Regulation by Interleukin-1*. Journal of Bone and Mineral Research, 1991. **6**(12): p. 1285-1294.
93. Liu, G.Z., et al., *Nitric oxide mediates the change of proteoglycan synthesis in the human lumbar intervertebral disc in response to hydrostatic pressure*. Spine, 2001. **26**(2): p. 134-41.
94. Lohse, C.L., D.M. Hyde, and D.R. Benson, *Comparative development of thoracic intervertebral discs and intra-articular ligaments in the human, monkey, mouse, and cat*. Acta Anat, 1985. **122**(4): p. 220-8.
95. Lorenzo, J.A., *The Role of Cytokines in the Regulation of Local Bone Resorption*. Critical Reviews in Immunology, 1991. **11**(3,4): p. 195-213.
96. Lotz, J.C. and J.R. Chin, *Intervertebral disc cell death is dependent on the magnitude and duration of spinal loading*. Spine, 2000. **25**(12): p. 1477-83.
97. Lotz, J.C., et al., *Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study*. Spine, 1998. **23**(23): p. 2493-506.
98. Lu, Y.M., W.C. Hutton, and V.M. Gharparay, *Can variations in intervertebral disc height affect the mechanical function of the disc?* Spine, 1996. **21**(19): p. 2208-16; discussion 2217.
99. Macy, N.B., et al., *Effect of disk fenestration on sagittal kinematics of the canine C5-C6 intervertebral space*. Vet Surg, 1999. **28**(3): p. 171-9.
100. Magnusson, M.L., et al., *Hyperextension and spine height changes*. Spine, 1996. **21**(22): p. 2670-5.
101. Maigne, J.Y., C. Treuil, and G. Chatellier, *Altered lower limb vascular perfusion in patients with sciatica secondary to disc herniation*. Spine, 1996. **21**(14): p. 1657-60.
102. Marletta, M.A., et al., *Macrophage Oxidation of L-Arginine to Nitrite and Nitrate: Nitric Oxide is an Intermediate*. Biochemistry, 1988. **27**(24): p. 8706-8711.
103. McIlwraith, C.W., *General Pathobiology of the Joint and Response to Injury*, in *Joint Disease in the Horse*, McIlwraith and Trotter, Editors. 1996, W.B. Saunders Company: Philadelphia. p. 40-69.
104. McKee, W.M., *A comparison of hemilaminectomy (with concomitant disc fenestration) and dorsal laminectomy for the treatment of thoracolumbar disc protrusion in dogs*. Vet Rec, 1992. **130**(14): p. 296-300.
105. Melrose, J., et al., *Topographical variation in the catabolism of aggrecan in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration*. J Spinal Disord, 1997. **10**(1): p. 55-67.
106. Melrose, J., et al., *Elevated synthesis of biglycan and decorin in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration*. Eur Spine J, 1997. **6**(6): p. 376-84.
107. Melrose, J., S. Smith, and P. Ghosh, *Differential expression of proteoglycan epitopes by ovine intervertebral disc cells*. J Anat, 2000. **197**(Pt 2): p. 189-98.
108. Mercer, S. and N. Bogduk, *The ligaments and annulus fibrosus of human adult cervical intervertebral discs*. Spine, 1999. **24**(7): p. 619-26; discussion 627-8.
109. Milgram, J.W., *Morphologic Alterations of the Subchondral Bone in Advanced Degenerative Arthritis*.

- Clinical Orthopaedics and Related Research, 1983. **173**(March): p. 293-312.
110. Miossec, P., C.A. Dinarello, and M. Ziff, *Interleukin-1 Lymphocyte Chemotactic Activity in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid*. Arthritis and Rheumatism, 1986. **29**(4, April): p. 461-470.
111. Mochida, J., et al., *The importance of preserving disc structure in surgical approaches to lumbar disc herniation*. Spine, 1996. **21**(13): p. 1556-63; discussion 1563-4.
112. Moore, R.J., et al., *Changes in endplate vascularity after an outer annulus tear in the sheep*. Spine, 1992. **17**(8): p. 874-8.
113. Moore, R.J., et al., *The origin and fate of herniated lumbar intervertebral disc tissue*. Spine, 1996. **21**(18): p. 2149-55.
114. Moore, R.J., et al., *Remodeling of vertebral bone after outer annular injury in sheep*. Spine, 1996. **21**(8): p. 936-40.
115. Mundy, G.R., *Cytokines and Local Factors Which Affect Osteoclast Function*. Int. J. Cell Cloning, 1992. **10**: p. 215-222.
116. Murrell, G.A., et al., *Nitric oxide: an important articular free radical*. J Bone Joint Surg Am, 1996. **78**(2): p. 265-74.
117. Nachemson, A., *Intradiscal measurements of pH in patients with lumbar rhizopathies*. Acta Orthop Scand, 1969. **40**(1): p. 23-42.
118. Nachemson, A. and G. Elfstrom, *Intravital dynamic pressure measurements in lumbar discs. A study of common movements, maneuvers and exercises*. Scand J Rehabil Med Suppl, 1970. **1**: p. 1-40.
119. Nagano, T., et al., *Distribution of the basic fibroblast growth factor and its receptor gene expression in normal and degenerated rat intervertebral discs*. Spine, 1995. **20**(18): p. 1972-8.
120. Nakama, S., et al., *A retrospective study of ventral fenestration for disk diseases in dogs*. J Vet Med Sci, 1993. **55**(5): p. 781-4.
121. Natarajan, V.a.A. *Effect of Type of Annular Incision On The Change In Biomechanical Properties In A Herniated Lumbar Intervertebral Disc*. in 44 th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society. 1998. New Orleans, Louisiana.
122. Necas, A., *[Results of surgical treatment in disorders of the thoracolumbar disks in dogs]*. Vet Med (Praha), 1995. **40**(7): p. 213-6.
123. Nemoto, O., et al. *IL-4 suppressed IL-1 Induced Matrix Metalloprotease-3 Production in Human Articular Cartilage*. in Transactions of the 40th Annual Meeting. 1994. New Orleans: Orthopaedic Research Society.
124. Nietfeld, J.J., et al., *Interleukin-1-Induced Interleukin-6 is Required for the Inhibition of Proteoglycan Synthesis by Interleukin-1 in Human Articular Cartilage*. Arthritis and Rheumatism, 1990. **33**(11, Nov.): p. 1695-1701.
125. Norrdin, R.W., W.S.S. Jee, and W.B. High, *The Role of Prostaglandins in Bone in Vivo*. Prostaglandin Leuk Essent Fatty, 1990. **41**: p. 139-149.
126. Nygaard, O.P., S.I. Mellgren, and B. Osterud, *The inflammatory properties of contained and noncontained lumbar disc herniation*. Spine, 1997. **22**(21): p. 2484-8.
127. O'Donnell, J.L. and A.L. O'Donnell, *Prostaglandin E2 content in herniated lumbar disc disease*. Spine, 1996. **21**(14): p. 1653-5; discussion 1655-6.
128. Oegema, T.R., Jr., *Biochemistry of the intervertebral disc*. Clin Sports Med, 1993. **12**(3): p. 419-39.
129. Oegema, T.R., Jr., et al., *Fibronectin and its fragments increase with degeneration in the human intervertebral disc*. Spine, 2000. **25**(21): p. 2742-7.
130. Oki, S., et al., *Morphologic differences of the vascular buds in the vertebral endplate: scanning electron microscopic study*. Spine, 1996. **21**(2): p. 174-7.
131. Olmarker, K. and K. Larsson, *Tumor necrosis factor alpha and nucleus-pulposus-induced nerve root injury*. Spine, 1998. **23**(23): p. 2538-44.
132. Olmarker, K., et al., *Ultrastructural changes in spinal nerve roots induced by autologous nucleus pulposus*. Spine, 1996. **21**(4): p. 411-4.
133. Olmarker, K., B. Rydevik, and C. Nordborg, *Autologous nucleus pulposus induces neurophysiologic and histologic changes in porcine cauda equina nerve roots*. Spine, 1993. **18**(11): p. 1425-32.

134. Osti, O.L., B. Vernon-Roberts, and R.D. Fraser, 1990 *Volvo Award in experimental studies. Anulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model.* Spine, 1990. **15**(8): p. 762-7.
135. Osti, O.L., et al., *Annular tears and disc degeneration in the lumbar spine. A post-mortem study of 135 discs.* J Bone Joint Surg Br, 1992. **74**(5): p. 678-82.
136. Otani, K., et al., *Experimental disc herniation: evaluation of the natural course.* Spine, 1997. **22**(24): p. 2894-9.
137. Otani, K., et al., *Nucleus pulposus-induced nerve root injury: relationship between blood flow and motor nerve conduction velocity.* Neurosurgery, 1999. **45**(3): p. 614-9; discussion 619-20.
138. Paajanen, H., et al., *Proliferation potential of human lumbar disc after herniation.* J Spinal Disord, 1999. **12**(1): p. 57-60.
139. Palmer, R.M.J., et al., *Glucocorticoids Do Not Affect the Induction of a Novel Calcium-Dependent Nitric Oxide Synthase in Rabbit Chondrocytes.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992. **188**(1): p. 209-215.
140. Palmgren, T., et al., *An immunohistochemical study of nerve structures in the anulus fibrosus of human normal lumbar intervertebral discs.* Spine, 1999. **24**(20): p. 2075-9.
141. Palmgren, T., et al., *Immunohistochemical demonstration of sensory and autonomic nerve terminals in herniated lumbar disc tissue.* Spine, 1996. **21**(11): p. 1301-6.
142. Park, J.B., et al., *Facet tropism: a comparison between far lateral and posterolateral lumbar disc herniations.* Spine, 2001. **26**(6): p. 677-9.
143. Park, J.B., et al., *Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue.* Spine, 2001. **26**(2): p. 142-6.
144. Passeri, G., et al., *Endogenous Production of Tumor Necrosis Factor by Primary Cultures of Murine Calvarial Cells: Influence on IL-6 Production and Osteoclast Development.* Bone and Mineral, 1994. **24**: p. 109-126.
145. Pearce, R.H., *Morphologic and Chemical Aspects of Aging*, in *Musculo skeletal soft tissue Aging: Impact on mobility*, J.A. Buckwalter, Goldberg, Woo, Editor. 1992, American Academy of Orthopedic Surgeons Symposium.
146. Pelletier, J.-P., et al., *The Increased Synthesis of Inducible Nitric Oxide Inhibits IL-1ra Synthesis by Human Articular Chondrocytes: Possible Role in Osteoarthritic Cartilage Degradation.* Osteoarthritis and Cartilage, 1996. **4**(1, March): p. 77-84.
147. Rand, N., et al., *Murine nucleus pulposus-derived cells secrete interleukins-1-beta, -6, and -10 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in cell culture.* Spine, 1997. **22**(22): p. 2598-601; discussion 2602.
148. Rannou, F., et al., *Sensitivity of anulus fibrosus cells to interleukin 1 beta. Comparison with articular chondrocytes.* Spine, 2000. **25**(1): p. 17-23.
149. Rasmussen, C., *Lumbar disc herniation: favourable outcome associated with intake of wine.* Eur Spine J, 1998. **7**(1): p. 24-8.
150. Repanti, M., et al., *Evolution of disc degeneration in lumbar spine: a comparative histological study between herniated and postmortem retrieved disc specimens.* J Spinal Disord, 1998. **11**(1): p. 41-5.
151. Roberts, S., et al., *Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc.* Spine, 2000. **25**(23): p. 3005-13.
152. Roberts, S., et al., *Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification.* Spine, 1996. **21**(4): p. 415-20.
153. Schollmeier, G., R. Lahr-Eigen, and K.U. Lewandrowski, *Observations on fiber-forming collagens in the anulus fibrosus.* Spine, 2000. **25**(21): p. 2736-41.
154. Seferlis, T., et al., *Conservative treatment in patients sick-listed for acute low-back pain: a prospective randomised study with 12 months' follow-up.* Eur Spine J, 1998. **7**(6): p. 461-70.

155. Simmons, E.D., Jr., et al., *Familial predisposition for degenerative disc disease. A case-control study.* Spine, 1996. **21**(13): p. 1527-9.
156. Simunic, D.I., N.D. Broom, and P.A. Robertson, *Biomechanical factors influencing nuclear disruption of the intervertebral disc.* Spine, 2001. **26**(11): p. 1223-30.
157. Snook, S.H., et al., *The reduction of chronic nonspecific low back pain through the control of early morning lumbar flexion. A randomized controlled trial.* Spine, 1998. **23**(23): p. 2601-7.
158. Stefanovic-Racic, M., J. Stadler, and C.H. Evans, *Nitric Oxide and Arthritis.* Arthritis and Rheumatism, 1993. **36**(8, August): p. 1036-1044.
159. Suk, K.S., et al., *Recurrent lumbar disc herniation: results of operative management.* Spine, 2001. **26**(6): p. 672-6.
160. Takahashi, H., et al., *Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine.* Spine, 1996. **21**(2): p. 218-24.
161. Takahashi, K., I. Shima, and R.W. Porter, *Nerve root pressure in lumbar disc herniation.* Spine, 1999. **24**(19): p. 2003-6.
162. Tatakis, D.N., *Interleukin-1 and Bone Metabolism: A Review.* Journal of Periodontology, 1993. **64**: p. 416-431.
163. Taylor, T.K., et al., *Spinal biomechanics and aging are major determinants of the proteoglycan metabolism of intervertebral disc cells.* Spine, 2000. **25**(23): p. 3014-20.
164. Tohno, S., et al., *Difference of mineral contents in human intervertebral disks and its age-related change.* Biol Trace Elem Res, 1996. **52**(2): p. 117-24.
165. Tolonen, J., et al., *Transforming growth factor beta receptor induction in herniated intervertebral disc tissue: an immunohistochemical study.* Eur Spine J, 2001. **10**(2): p. 172-6.
166. Tolonen, J., et al., *Platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor expression in disc herniation tissue: and immunohistochemical study.* Eur Spine J, 1997. **6**(1): p. 63-9.
167. Virri, J., et al., *Prevalence, morphology, and topography of blood vessels in herniated disc tissue. A comparative immunocytochemical study.* Spine, 1996. **21**(16): p. 1856-63.
168. Walker, B., *Intervertebral disc disease,* in *Textbook of Small animal Surgery,* Slatter, Editor. 1993, W.B. Saunders Company: Philadelphia.
169. Wang, J.C., H.H. Bohlman, and K.D. Riew, *Dural tears secondary to operations on the lumbar spine. Management and results after a two-year-minimum follow-up of eighty-eight patients.* J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(12): p. 1728-32.
170. Waters, D.J., et al., *Immobilization Increases Bone Prostaglandin E.* Acta Orthopaedica Scandinavia, 1991. **62**(3): p. 328-243.
171. Watkins, J.P., *Osteochondrosis,* in *Equine Surgery,* J.A. Auer, Editor. 1992, W. B. Saunders Company: Philadelphia, PA. p. 971-984.
172. Watrous, D.A. and B.S. Andrews, *The Metabolism and Immunology of Bone.* Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1989. **19**(1, Aug.): p. 45-65.
173. Wilke, H.J., A. Kettler, and L.E. Claes, *Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines?* Spine, 1997. **22**(20): p. 2365-74.
174. Wilke, H.J., et al., *Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine.* Anat Rec, 1997. **247**(4): p. 542-55.
175. Wimalawansa, S.J., et al., *Prevention of Corticosteroid-Induced Bone Loss With Nitric Oxide Donor Nitroglycerin in Male Rats.* Bone, 1997. **21**(3): p. 275-280.
176. Woertgen, C., R.D. Rothoerl, and A. Brawanski, *Influence of macrophage infiltration of herniated lumbar disc tissue on outcome after lumbar disc surgery.* Spine, 2000. **25**(7): p. 871-5.
177. Yabuki, S., et al., *Acute effects of nucleus pulposus on blood flow and endoneurial fluid pressure in rat dorsal root ganglia.* Spine, 1998. **23**(23): p. 2517-23.
178. Yasui, T., et al., *The Effect of Hyaluronan on Interleukin-1 α Induced Prostaglandin E2 Production in Human Osteoarthritic Synovial Cells.* Agents and Actions, 1992. **37**: p. 155-156.
179. Yorimitsu, E., et al., *Long-term outcomes of standard discectomy for*

- lumbar disc herniation: a follow-up study of more than 10 years.* Spine, 2001. **26**(6): p. 652-7.
180. Yoshihara, K., et al., *Histochemical changes in the multifidus muscle in patients with lumbar intervertebral disc herniation.* Spine, 2001. **26**(6): p. 622-6.
181. Zhao, W.P., et al., *Histochemistry and morphology of the multifidus muscle in lumbar disc herniation: comparative study between diseased and normal sides.* Spine, 2000. **25**(17): p. 2191-9.

Anhang

1. Blutparameter und Referenzwerte

Hämatologie		Enzyme	
Hämatokrit	0.27-46.0 %	Alkal. Phosphatase	68-387 u/l
Hämoglobin	9.0-15.0 g/dl	Amylase	
Erythrozyten	$9.0-15.0 \times 10^6/\mu\text{l}$	ASAT (GOT)	260-350 u/l
Leukozyten	$4-12 \times 10^3/\mu\text{l}$	ALAT (GPT)	14-44 u/l
MCH	28-40 fl	γ GT	0-70 u/l
MCHC	8-12 pg	LDH	238-440 u/l
MCV	31-34 g/dl	Elektrolyte	
Chemie: Metabolite		Natrium	145-160 mmol/l
Bilirubin gesamt	0-6 $\mu\text{mol/l}$	Kalium	4.8-5.9 mmol/l
Harnstoff	3.0-7.0 mmol/l	Kalzium	2.86-3.24 mmol/l
Kreatinin	110-170 $\mu\text{mol/l}$	Phosphor	1.30-2,25 mmol/l
Protein (Biuret)	60-79 g/l	Eisen	30-40 $\mu\text{l/l}$
Albumin	24-30 g/l		
Cholesterin	1.05-1.50 mmol/l		
Triglyceride	0.06-0.34 mmol/l		

2. Protokoll der neurologischen Untersuchung

Blasenfunktion:

Analreflex : areflektisch, hyporeflektisch, normoreflektisch, hyperreflektisch

Panniculus-reflex :

Klassifikation der Parese oder Paralysegrade
Grad 5: Normale Stärke
Grad 4 : Selbstständiges Stehen, minimale Ataxie
Grad 3 : Selbstständiges Stehen häufiges Stolpern, mässige Ataxie
Grad 2 : Stehen mit Assistenz, Stolpern und Umfallen
Grad 1 : Kein selbstständiges Stehen, leichte Bewegungen mit Unterstützung
Grad 0 : Abwesenheit von sinnvollen Bewegungen

3. Präparationsprotokoll der Bandscheibenproben

Formalin 4 %	4 Tage	Raumtemperatur
Deionisiertes Wasser	3 x 20 Minuten	Raumtemperatur
Ethanol 50 %	3 x 30 Minuten	Raumtemperatur
Ethanol 70 %	2 x 12 Stunden	Raumtemperatur
Ethanol 80 %	2 x 12 Stunden	Raumtemperatur
Ethanol 90 %	12 Stunden	Raumtemperatur

Ethanol 96 %	12 Stunden	Raumtemperatur
Ethanol 100 %	4 x 12 Stunden	Raumtemperatur
Xylol infiltration im Vakuum	30 Minuten	Raumtemperatur
Xylol (Vakuumbehälter)	24 Stunden	4 ° C
Xylol infiltration im Vakuum	30 Minuten	Raumtemperatur
Xylol (Vakuumbehälter)	3 Tage	4 ° C
PMMA Infiltration im Vakuum	30 Minuten	Raumtemperatur
PMMA (Vakuumbehälter)	14 Tage	4 ° C

4. Protokoll des Umschreibens von RNA in cDNA

Alle aufgeführten Reagenzien stammen von Promega, Catalys AG, Wallisellen, Schweiz

Lösung 1 : 10x Dnase Puffer 1 µl
 Dnase 1 µl
 Rnasin 0,5 µl

7,5 µl der Probe (isolierte RNA) + 2,5 µl Lösung 1
 Inkubation bei 37 ° C für 30 Minuten
 1 µl Stop-Solution hinzufügen
 Inkubation bei 65 ° C für 10 Minuten

Reverse Transcriptase-Schritt :

MgCl 25 mM 5 µl
 + 5xRT-Puffer 5 µl
 + dNTP`s 10 mM 2,5 µl
 + rRNAsin 0,5 µl
 + AMV RT 1,25 µl
 + Primer Random hex. 1,25 µl
 + Probe 10 µl

gesamt: 25,5 µl

Inkubation bei 20 ° C für 10 Minuten

Inkubation bei 42 ° C für 60 Minuten

Inkubation bei 95 ° C für 5 Minuten

Inkubation bei 4 ° C für 5 Minuten

Zentrifugation bei 14000 RpM für 20 Sekunden

Probe (25,5 µl) + DEPEC- Wasser 74,5 µl

Lagerung bei -20 ° C

5. Liste der verwendeten Primer

Alle aufgelisteten Primer wurden hergestellt von Microsynth GmbH, Balgach, Schweiz

Interleukin 1

-oIL1.82p

5`CCTAAACAGATGAAGTGC ACC CAACA`3

-oIL1.56f 28nmol (L = 25):

5`ATGAGCTGTTATTTGAGGTTGATGG`3

-oIL1.161r 69nmol (L = 22):

5`TGAGAAATCTGCAGCTGGATGT`3

Interleukin 6

-oIL6.192p

5`CGTCATTCTTCTCACATATCTCCTTTCTTATTGCAGAG`3

-oIL6.271f 42nmol (L = 24):

5`TCAGCTTATTTTCTGCCAGTGTCT`3

-oIL6.167r 38nmol (L = 23):

5`TCATTAAGCACATCGTCGACAAA`3

Induzierbare Stickoxid Synthetase

-oNOS.282f 46nmol (L = 22):

5`TGACTTTCCAAGACACGCTTCA`3

-oNOS.373r 23nmol (L = 23):

5`ÀCTTTTGGGATTCATGATGGAT`3

Cyclooxygenase 2

-oCOX.150p

5`TGAAACTGTACCACACCTGAATTTCTGACAAGA`3

-oCOX.71f 40nmol (L = 24):

5`CATGCCAGAATCGAGGTGTATGTA`3`

-oCOX.211r 30nmol (L = 20):

5`CGGGAGTGGGTTTCAGGAGT`3

GAPDH

-oGAPDH.489p

5`ATACCCTCAAGATTGTCAGCAATGCCTCCT`3

-oGAPDH.463f 34nmol (L = 23)

5`GGCGTGAACACGAGAAGTATAA`3

-oGAPDH.582r 51nmol (L = 18)

5`CCCTCCACGATGCCAAAGT`3

6. PCR Werte

PCR Werte der Cyclooxygenase 2 (COX-2)

Schafnr.	Zeit	GAPDH	COX-2	Delta COX	DeltaDelta COX	dd COX
1101	3-asd	24.825	30.09	5.265	5.445	43.5620517
1102	3-asd	22.09	30.55	8.46	2.25	4.75682846
1103	3-asd	28.69	34.26	5.57	5.14	35.2609637
1104	3-sham	21.5	33.21	11.71	-1	-2
1105	3-sham	25.38	30.57	5.19	5.52	45.8865679
1106	3-sham	21.64	29.42	7.78	2.93	7.62110398
1110	5-asd	28.735	33.59	4.855	5.855	57.8802802
1111	5-asd	28.42	33.3	4.88	5.83	56.8859316
1112	5-asd	21.28	25.75	4.47	6.24	75.5835303
1115	6-asd	28.28	31.05	2.77	7.94	245.571615
1116	6-asd	26.6	33.47	6.87	3.84	14.3204011
1118	6-asd	28.995	33.495	4.5	6.21	74.0280438
1119	6-sham	28.525	36.115	7.59	3.12	8.6938789
1120	6-sham	29	37.93	8.93	1.78	3.43426175
1121	6-sham	23.49	29.03	5.54	5.17	36.0018715
1122	7-asd	23.9	30.43	6.53	4.18	18.1261422
1123	7-asd	22.37	31.69	9.32	1.39	2.62078681
1124	7-asd	28.17	31.6	3.43	7.28	155.416945
1125	7-sham	28.135	30.43	2.295	8.415	341.324461
1126	7-sham	24.89	30.85	5.96	4.75	26.9086853
1127	7-sham	25.18	32.15	6.97	3.74	13.3614067
Test		23.71	34.42	10.71	0	
Blank		45	45	0	10.71	

Spalte1 (Schafnr.) : Liste der Schafnummern, Test : Probe eines nicht operierten Tieres, Blank : Leerprobe

Spalte 2 (Zeit) : Postoperativer Zeitabstand, gefolgt von der Unterscheidung in Implantationsgruppe (ASD) und Kontrollgruppe (sham)

Spalte 3 (GAPDH) : CT Werte des housekeeping gens GAPDH, der CT Wert entspricht der Zahl der Zyklen die benötigt wurden bis ein definierter Fluoreszenzwert erreicht wurde, maximal möglich waren 45 Zyklen.

Spalte 4 (COX-2) : CT Werte der COX-2

Spalte 5 (Delta COX) : Der korrigierte CT Wert errechnet sich aus dem CT Wert von COX-2 minus dem CT Wert von GAPDH.

Spalte 6 (DeltaDelta COX) : Darstellung des korrigierten CT Wertes (Delta COX) in Abhängigkeit des Testwertes (Testwert minus Delta COX)

Spalte 7 (dd COX) : lineare Darstellung der DeltaDelta COX Werte

COX	3	5	6	7
ASD AV	87.1241035	63.449914	111.306686	58.7212914
Sham AV	17.169224		16.0433374	127.198184

ASD STDEV	20.4338595	10.519775	120.048131	84.0989959
Sham STDEV	25.3309256		17.4835124	185.562467

Reihe 1 (COX) : Postoperativer Zeitabstand in Monaten

Reihe 2 (ASD AV) : Durchschnittswerte der dd COX Werte aus der Implantationsgruppe (ASD)

Reihe 3 (Sham AV) : Durchschnittswerte der dd COX Werte aus der Kontrollgruppe (Sham)

Reihe 4 (ASD STDEV) : Standardabweichung der Durchschnittswerte der Implantationsgruppe

Reihe 5 (Sham STDEV) : Standardabweichung der Durchschnittswerte der Kontrollgruppe

PCR Werte von Interleukin 1 (IL-1)

Schafnr.	Zeit	GAPDH	IL-1	Delta IL-1	DeltaDelta IL-1	dd IL-1
1101	3-asd	24.825	32	7.175	3.185	9.09453579
1102	3-asd	22.09	32.46	10.37	-0.01	-1.0069556
1103	3-asd	28.69	33	4.31	6.05	66.2569551
1104	3-sham	21.5	33.89	12.39	-2.03	-4.0840485
1105	3-sham	25.38	32.91	7.53	2.83	7.11074145
1106	3-sham	21.64	30.28	8.64	1.72	3.29436407
1110	5-asd	28.735	34.7	5.965	4.395	21.0390842
1111	5-asd	28.42	35.03	6.61	3.75	13.4543426
1112	5-asd	21.28	29.46	8.18	2.18	4.53153554
1115	6-asd	28.28	30.85	2.57	7.79	221.321531
1116	6-asd	26.6	34.045	7.445	2.915	7.54227629
1118	6-asd	28.995	34.36	5.365	4.995	31.8892884
1119	6-sham	28.525	34.68	6.155	4.205	18.4429815
1120	6-sham	29	45	16	-5.64	-49.866533
1121	6-sham	23.49	31.2	7.71	2.65	6.27667278
1122	7-asd	23.9	30.95	7.05	3.31	9.9176616
1123	7-asd	22.37	31.77	9.4	0.96	1.94530989
1124	7-asd	28.17	32.64	4.47	5.89	59.301636
1125	7-sham	28.135	34.22	6.085	4.275	19.3599054
1126	7-sham	24.89	34.32	9.43	0.93	1.905276
1127	7-sham	25.18	32.47	7.29	3.07	8.39773347
Test		23.71	34.07	10.36	0	
Blank		45	45	0	10.36	

Spalte 1 (Schafnr.) : Liste der Schafnummern, Test : Probe eines nicht operierten Tieres, Blank : Leerprobe

Spalte 2 (Zeit) : Postoperativer Zeitabstand, gefolgt von der Unterscheidung in Implantationsgruppe (ASD) und Kontrollgruppe (sham)

Spalte 3 (GAPDH) : CT Werte des housekeeping gens GAPDH, der CT Wert entspricht der Zahl der Zyklen die benötigt wurden bis ein definierter Fluoreszenzwert erreicht wurde, maximal möglich waren 45 Zyklen.

Spalte 4 (IL-1) : CT Werte von IL-1

Spalte 5 (Delta IL-1) : Der korrigierte CT Wert errechnet sich aus dem CT Wert von IL-1 minus dem CT Wert von GAPDH.

Spalte 6 (DeltaDelta IL-1) : Darstellung des korrigierten CT Wertes (Delta IL-1) in Abhängigkeit des Testwertes (Testwert minus Delta IL-1)

Spalte 7 (dd IL-1) : lineare Darstellung der DeltaDelta IL-1 Werte

IL-1	3	5	6	7
ASD AV	24.7815118	13.0083208	86.9176986	23.7215358
Sham AV	2.10701901		-8.3822929	9.8876383

ASD STDEV	36.2721564		8.26280776	117.031991	31.0700377
Sham STDEV	5.69106069			36.4377744	8.82218139

Reihe 1 (IL-1) : Postoperativer Zeitabstand in Monaten

Reihe 2 (ASD AV) : Durchschnittswerte der dd IL-1 Werte aus der Implantationsgruppe (ASD)

Reihe 3 (Sham AV) : Durchschnittswerte der dd IL-1 Werte aus der Kontrollgruppe (Sham)

Reihe 4 (ASD STDEV) : Standardabweichung der Durchschnittswerte der Implantationsgruppe

Reihe 5 (Sham STDEV) : Standardabweichung der Durchschnittswerte der Kontrollgruppe

PCR Werte von Interleukin 6 (IL-6)

Schafnr.	Zeit	GAPDH	IL-6	Delta IL-6	DeltaDelta IL-6	dd IL-6
1101	3-asd	24.825	39.22	14.395	1.655	3.14923191
1102	3-asd	22.09	40.01	17.92	-1.87	-3.6553258
1103	3-asd	28.69	39.02	10.33	5.72	52.7098251
1104	3-sham	21.5	33.8	12.3	3.75	13.4543426
1105	3-sham	25.38	38.06	12.68	3.37	10.3388226
1106	3-sham	21.64	36.06	14.42	1.63	3.09512999
1110	5-asd	28.735	39.48	10.745	5.305	39.5333964
1111	5-asd	28.42	39.04	10.62	5.43	43.1114745
1112	5-asd	21.28	30.39	9.11	6.94	122.785807
1115	6-asd	28.28	41.19	12.91	3.14	8.81524093
1116	6-asd	26.6	40.085	13.485	2.565	5.91755004
1118	6-asd	28.995	41.235	12.24	3.81	14.0256915
1119	6-sham	28.525	40.715	12.19	3.86	14.5203065
1120	6-sham	29	45	16	0.05	1.03526492
1121	6-sham	23.49	34.47	10.98	5.07	33.5909339
1122	7-asd	23.9	40.69	16.79	-0.74	-1.6701758
1123	7-asd	22.37	40.4	18.03	-1.98	-3.9449308
1124	7-asd	28.17	38.49	10.32	5.73	53.0764509
1125	7-sham	28.135	36.6	8.465	7.585	192.004991
1126	7-sham	24.89	34.44	9.55	6.5	90.509668
1127	7-sham	25.18	38.12	12.94	3.11	8.63382589
Test		23.71	39.76	16.05	0	
Blank		45	45	0	16.05	

Spalte 1 (Schafnr.) : Liste der Schafnummern, Test : Probe eines nicht operierten Tieres, Blank : Leerprobe

Spalte 2 (Zeit) : Postoperativer Zeitabstand, gefolgt von der Unterscheidung in Implantationsgruppe (ASD) und Kontrollgruppe (sham)

Spalte 3 (GAPDH) : CT Werte des housekeeping gens GAPDH, der CT Wert entspricht der Zahl der Zyklen die benötigt wurden bis ein definierter Fluoreszenzwert erreicht wurde, maximal möglich waren 45 Zyklen.

Spalte 4 (IL-6) : CT Werte von IL-6

Spalte 5 (Delta IL-6) : Der korrigierte CT Wert errechnet sich aus dem CT Wert von IL-6 minus dem CT Wert von GAPDH.

Spalte 6 (DeltaDelta IL-6) : Darstellung des korrigierten CT Wertes (Delta IL-6) in Abhängigkeit des Testwertes (Testwert minus Delta IL-6)

Spalte 7 (dd IL-1) : lineare Darstellung der DeltaDelta IL-6 Werte

IL-6	3	5	6	7
ASD AV	17.4012437	68.4768927	9.58616084	15.8204481
Sham AV	8.96276509		16.3821684	97.0494948

ASD STDEV	30.7668237	47.0669131	4.10867713	32.2846858
Sham STDEV	5.31492921		16.3574996	91.8603452

Reihe 1 (IL-6) : Postoperativer Zeitabstand in Monaten

Reihe 2 (ASD AV) : Durchschnittswerte der dd IL-6 Werte aus der Implantationsgruppe (ASD)

Reihe 3 (Sham AV) : Durchschnittswerte der dd IL-6 Werte aus der Kontrollgruppe (Sham)

Reihe 4 (ASD STDEV) : Standardabweichung der Durchschnittswerte der Implantationsgruppe

Reihe 5 (Sham STDEV) : Standardabweichung der Durchschnittswerte der Kontrollgruppe

PCR Werte der induzierbaren Stickoxidsynthetase (iNOs)

Schafnr.	Zeit	GAPDH	iNOs	Delta iNOS	DeltaDelta iNOS	ddiNOS
1101	3-asd	24.825	39.57	14.745	-1.775	-3.55
1102	3-asd	22.09	33.62	11.53	1.44	2.71320865
1103	3-asd	28.69	40.3	11.61	1.36	2.5668518
1104	3-sham	21.5	34.89	13.39	-0.42	-1.3379276
1105	3-sham	25.38	35.87	10.49	2.48	5.57897467
1106	3-sham	21.64	35.4	13.76	-0.79	-1.7290745
1110	5-asd	28.735	37	8.265	4.705	26.0823146
1111	5-asd	28.42	36.37	7.95	5.02	32.4467034
1112	5-asd	21.28	34.03	12.75	0.22	1.16473359
1115	6-asd	28.28	37.75	9.47	3.5	11.3137085
1116	6-asd	26.6	37.385	10.785	2.185	4.54726789
1118	6-asd	28.995	36.46	7.465	5.505	45.4119474
1119	6-sham	28.525	37.54	9.015	3.955	15.5086371
1120	6-sham	29	37.23	8.23	4.74	26.7228134
1121	6-sham	23.49	38.59	15.1	-2.13	-4.3771748
1122	7-asd	23.9	34.37	10.47	2.5	5.65685425
1123	7-asd	22.37	35.96	13.59	-0.62	-1.5368752
1124	7-asd	28.17	34.56	6.39	6.58	95.6703519
1125	7-sham	28.135	37.98	9.845	3.125	8.72406186
1126	7-sham	24.89	36.08	11.19	1.78	3.43426175
1127	7-sham	25.18	35.71	10.53	2.44	5.42641731
Test		23.71	36.68	12.97	0	
Blank		45	45	0	12.97	

Spalte1 (Schafnr.) : Liste der Schafnummern, Test : Probe eines nicht operierten Tieres, Blank : Leerprobe

Spalte 2 (Zeit) : Postoperativer Zeitabstand, gefolgt von der Unterscheidung in Implantationsgruppe (ASD) und Kontrollgruppe (sham)

Spalte 3 (GAPDH) : CT Werte des housekeeping gens GAPDH, der CT Wert entspricht der Zahl der Zyklen die benötigt wurden bis ein definierter Fluoreszenzwert erreicht wurde, maximal möglich waren 45 Zyklen.

Spalte 4 (IL-6) : CT Werte von iNOs

Spalte 5 (Delta iNOs) : Der korrigierte CT Wert errechnet sich aus dem CT Wert von iNOs minus dem CT Wert von GAPDH.

Spalte 6 (DeltaDelta iNOs) : Darstellung des korrigierten CT Wertes (Delta iNOs) in Abhängigkeit des Testwertes (Testwert minus Delta iNOs)

Spalte 7 (dd iNOs) : lineare Darstellung der DeltaDelta iNOs Werte

iNOs	3	5	6	7
ASD AV	0.61922678	19.8979172	20.4243079	33.2634437
Sham AV	0.83732422		12.6180919	5.86158031

ASD STDEV	3.50089913	16.5325584	21.9028029	54.1655249
Sham STDEV	4.11104436		15.7501986	2.67161401

Reihe 1 (iNOs) : Postoperativer Zeitabstand in Monaten

Reihe 2 (ASD AV) : Durchschnittswerte der dd iNOs Werte aus der Implantationsgruppe (ASD)

Reihe 3 (Sham AV) : Durchschnittswerte der dd iNOs Werte aus der Kontrollgruppe (Sham)

Reihe 4 (ASD STDEV) : Standardabweichung der Durchschnittswerte der Implantationsgruppe

Reihe 5 (Sham STDEV) : Standardabweichung der Durchschnittswerte der Kontrollgruppe

Danksagung

Ich danke folgenden Personen,

Mein tiefster Dank gilt Frau PD Dr. Brigitte von Rechenberg, für eine Betreuung der Doktorarbeit, die ich mir nicht besser vorstellen kann und die Lieferungen von Tiefkühlpizza.

Herrn PD. Dr. N. Boos, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. J.A. Auer, für seine Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Vielen Dank an Felix Theiss, Jessika Xenia Abigail Müller und Tobias Neuberger für gutes Teamwork und Kaffeepausen.

Herrn Dr. D Haldimann, Endospine Ltd., danke ich für seine Unterstützung und enge Zusammenarbeit.

Ein ausserordentlicher Dank an Kati Zlinszky und Sabina Wunderlin für die geduldige Hilfe bei der Aufbereitung meiner Proben.

Vielen Dank an Monika Hilbe, die jederzeit Bereitschaft zeigte, mir beim Mikroskopieren zu helfen und Adrian Fairburn für seine Hilfe bei der PCR.

Viktor Haus, René Kissling, Hans Oesch, Bruno Gerzner, Vinzenz Burger, Andreas Baumann, Werner Holder, Kurt Oertle gebührt besonderer Dank für die Betreuung und Hilfe mit den Schafen, sowie für die Unterstützung meiner teilweise chaotischen Organisation.

Ich danke Myriam Schaerz dafür, dass Sie meine Launen ertragen hat, wenn es mit der Doktorarbeit nicht so lief, wie ich es mir vorstellte, für Ihre konstruktive Hilfsbereitschaft, für Ihr wunderschönes Lächeln und jede gemeinsame Minute. HDL., Danke

Curriculum vitae

Geburt: 17. 11. 1973 in Büdingen

Schulischer Werdegang :

1980-1984 : Grundschule am Stadtpark, Lübeck

1984-1993 : Ernestinenschule zu Lübeck

1993 : Abitur

1993-1994 : Zivildienst in der Interdisziplinären Notaufnahme der
Medizinischen Universität zu Lübeck

Studium :

1994-2000 : Veterinär-Medizinische Fakultät der Justus-Liebig-Universität,
Giessen, Deutschland

Weitere Ausbildung :

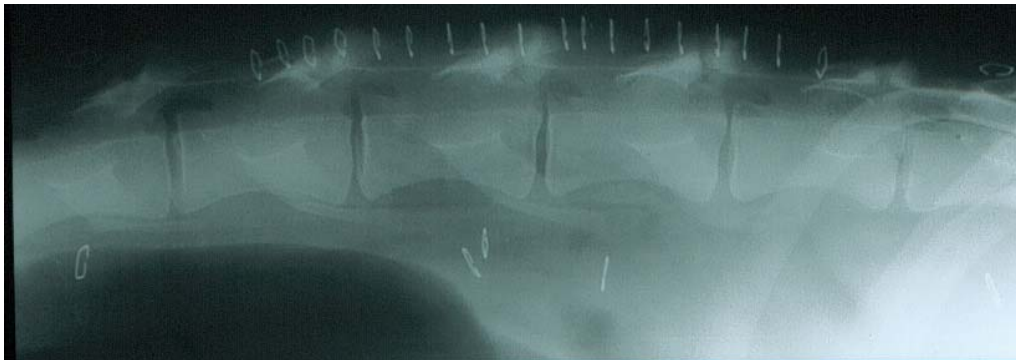
2000-2001 : Dissertation an der Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen
Universität, der Universität Zürich, Muskulo-Skeletal-Research-Unit

seit dem 19. 11. 2001 Internship bei Croft Vets, Blyth, Northumberland,
England

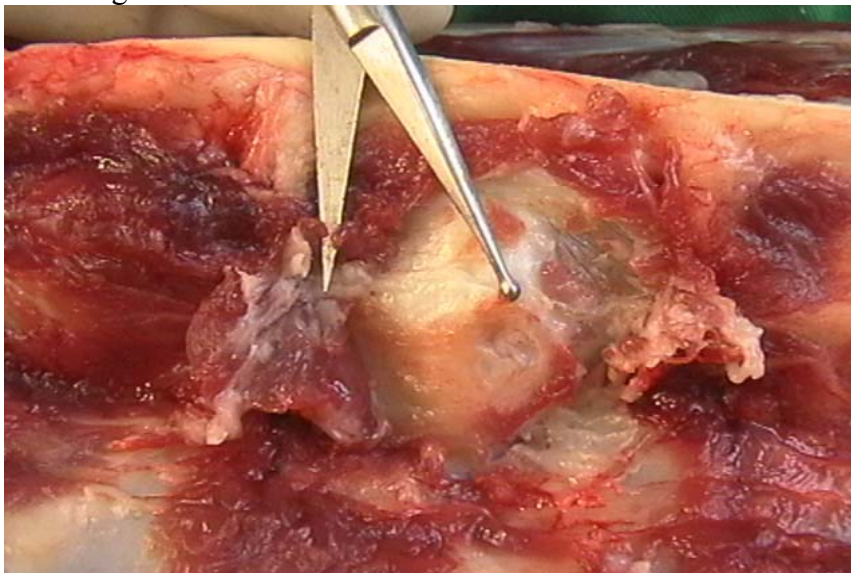
e-mail: bastianbrand@yahoo.de

Bildanhang

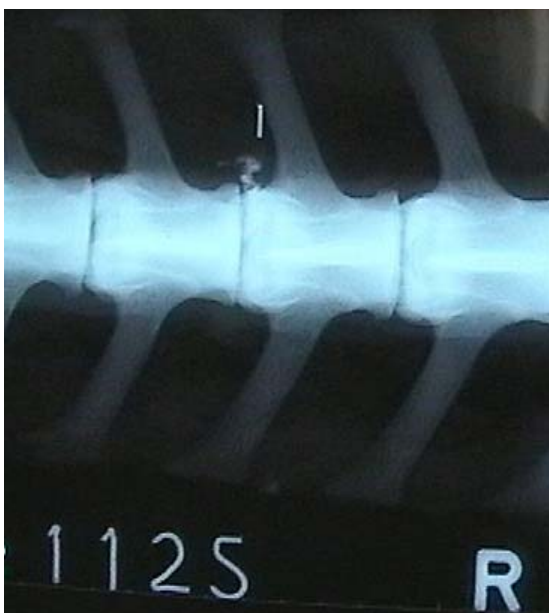
Bildanhang 1



Bildanhang 2



Bildanhang 3



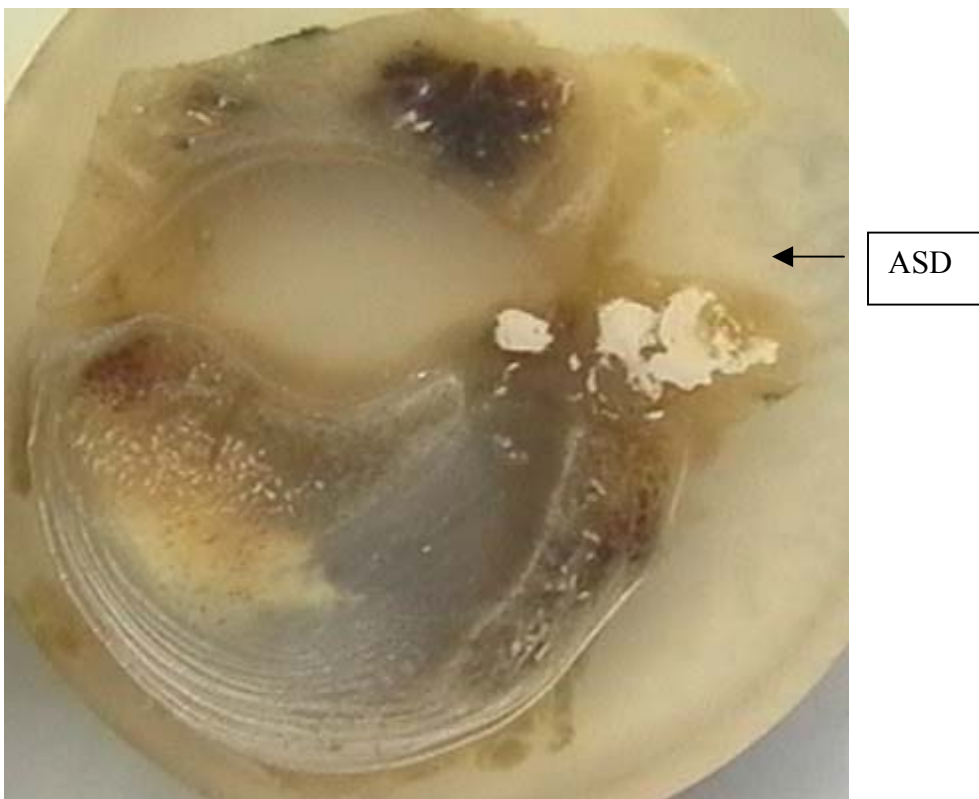
Bildanhang 3a



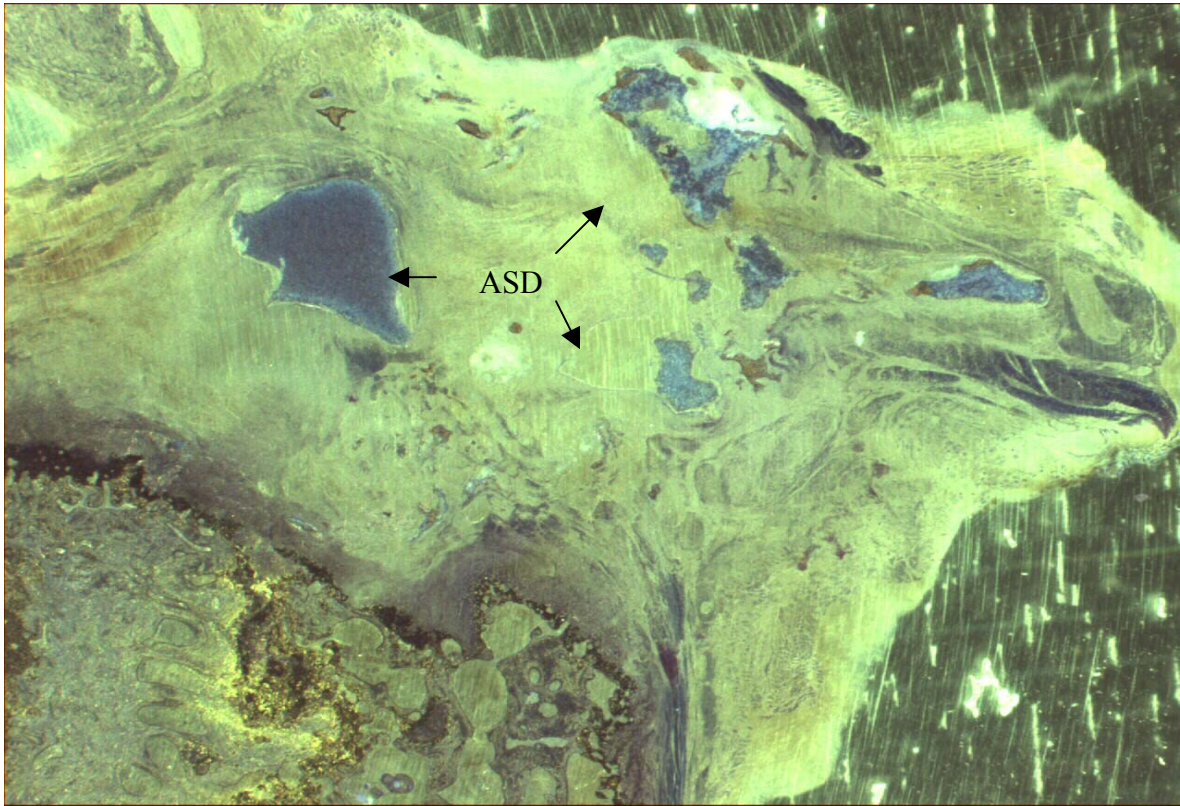
Bildanhang 4



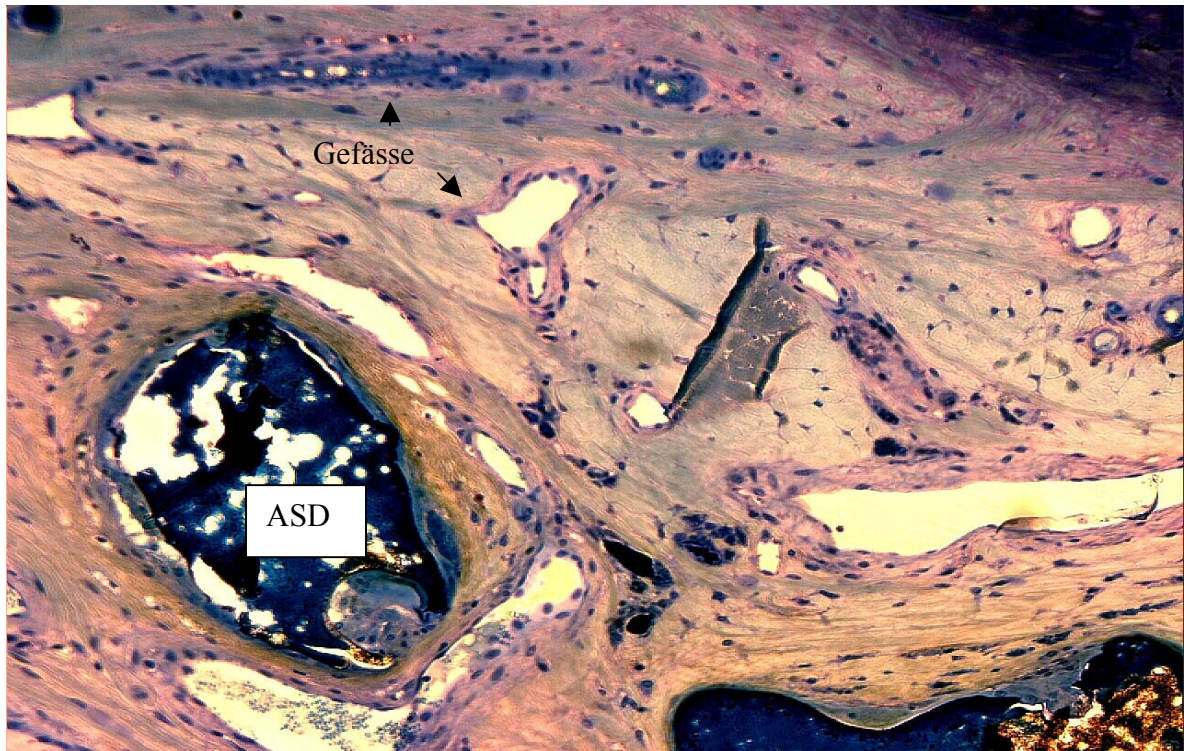
Bildanhang 5



Bildanhang 5a (Vergrößerung Bildanhang 5)



Bildanhang 6



Bildanhang 7

